



TITLE:

Annual Report of the Institute for Virus Research, Kyoto University, Volume.57, 2014

AUTHOR(S):

CITATION:

Annual Report of the Institute for Virus Research, Kyoto University, Volume.57, 2014.
Annual Report of the Institute for Virus Research, Kyoto University 2015, 57

ISSUE DATE:

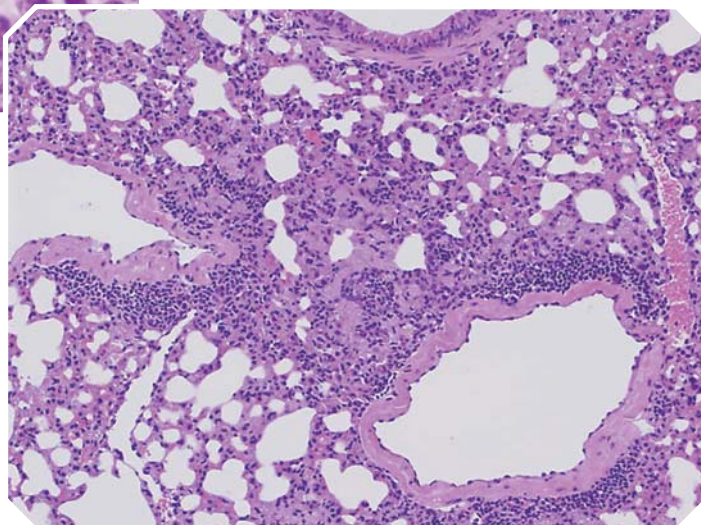
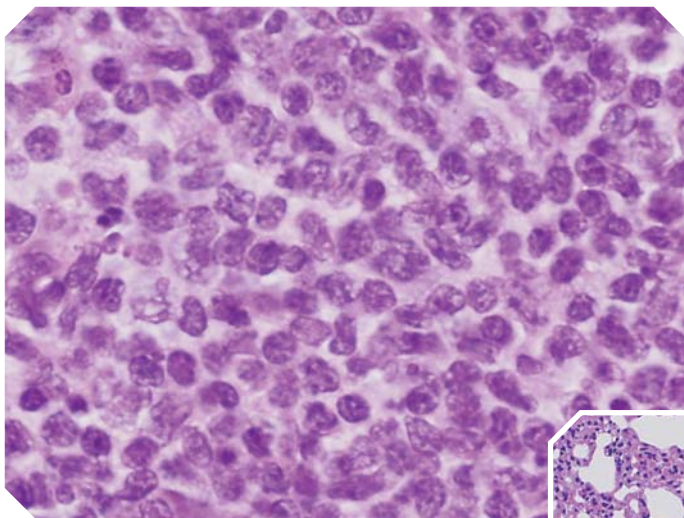
2015-06-22

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/198874>

RIGHT:

**Annual Report of the
Institute for Virus Research
Kyoto University
Volume 57
2014**



**ANNUAL REPORT OF THE INSTITUTE
FOR VIRUS RESEARCH 2014**

京都大学ウイルス研究所年報

**ANNUAL REPORT OF THE INSTITUTE
FOR VIRUS RESEARCH, KYOTO UNIVERSITY**

VOLUME 57

Editorial Board
Toshiyuki Ohtsuka (Editor in Chief)
Ryoichiro Kageyama, Osamu Takeuchi,
Hiroki Kato

2014

THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH
KYOTO UNIVERSITY

PUBLISHED BY
THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH, KYOTO UNIVERSITY
SHOGON-KAWAHARACHO, SAKYO-KU, KYOTO 606-8507, JAPAN

Cover:

HTLV-1 bZIP factor (HBZ) transgenic mice developed T-cell lymphoma (left) and inflammatory diseases in the lung (right). These data suggest that HBZ plays important roles in pathogenesis by HTLV-1.

CONTENTS

<u>Chronological Table</u>	1	
<u>Research Activities</u>		
Department of Viral Oncology （がんウイルス研究部門）		
Laboratory of Gene Analysis （がん遺伝子研究分野）	7	
Laboratory of Cell Regulation （細胞制御研究分野）	17	
Laboratory of Tumor Biogenesis （生体発がん機構研究分野）	23	
Laboratory of Human Tumor Viruses （ヒトがんウイルス研究分野）	31	
Department of Genetics and Molecular Biology （遺伝子動態調節研究部門）		
Laboratory of Molecular Genetics （分子遺伝学研究分野）	43	
Laboratory of Biochemistry （情報高分子化学研究分野）	51	
Department of Biological Responses （生体応答学研究部門）		
Laboratory of Biological Protection （生体防御研究分野）	61	
Laboratory of Infection and Prevention （感染防御研究分野）	66	
Department of Cell Biology （細胞生物学研究部門）		
Laboratory of Subcellular Biogenesis （構造形成学研究分野）	77	
Laboratory of Growth Regulation （増殖制御学研究分野）	82	
Laboratory of Signal Transduction （信号伝達学研究分野）	91	
Center for Human Retrovirus Research （附属ヒトレトロウイルス研究施設）		
Laboratory of Viral Pathogenesis （ウイルス病態研究領域）	102	
Laboratory of Virus Control （ウイルス制御研究領域）	114	
Experimental Research Center for Infectious Diseases （附属感染症モデル研究センター）		
Laboratory of Primate Model （霊長類モデル研究領域）	123	
Laboratory of Evolutional Virology （進化ウイルス研究領域）	130	
Center for Emerging Virus Research （附属新興ウイルス研究センター）	138	
Reproductive Engineering Team （動物実験委員会マウス作製支援チーム）	144	
Computer Network of Institute for Virus Research （ウイルス研究所コンピューターネットワークシステム）		148
<u>Seminars of the Institute for Virus Research</u>	150	
<u>Organization and Staff</u> （構成員）	152	

CHRONOLOGICAL TABLE

1956 April	Institute for Virus Research, Kyoto University, was founded with two departments (Pathology and Biophysics).
1956 April	Scientific Lectures for the Public were presented commemorating the opening of the Institute (the successive Memorial Lecture Series have been presented annually hereafter).
1957 April	Department of Biochemistry and Department of Serology and Immunology were established.
1958 April	Department of Prevention and Therapeutics was established.
1958 December	"Advances in Virology", Vol. 1 (in Japanese) was published as collection of the Memorial Lectures (the successive volumes were published annually hereafter until 1960).
1958 December	"Annual Report of the Institute for Virus Research", Vol. 1, was published (the successive volumes have been published annually hereafter).
1959 July	Virus Diagnosis Center was established.
1961 October	The 1st Symposium of the Institute for Virus Research was held under the auspices of the Institute with the nationwide participants. The proceedings of the Symposium were published as the first issue of the new series of "Advances in Virology" in Japanese (the successive Symposia have been held and their proceedings published annually hereafter).
1962 April	Department of Tumor Virus was established.
1962 October	Several staff members were appointed academic staff of the Graduate School of Medicine, and students of the School were first admitted to the Institute.
1962 December	Several staff members were appointed academic staff of the Graduate School of Science, and students of the School were first admitted to the Institute.
1964 April	Virus Diagnosis Center was renamed Virological Diagnosis Center.
1965 September	Construction of the new building for the Institute commenced.
1967 March	Construction of the new building was completed.
1968 April	Department of Genetics was established.
1974 April	Department of Molecular and Cellular Virology was established.
1977 April	Department of Neurological Virus Disease was established as such that Visiting Staff be appointed.
1978 April	Animal Laboratory for Experimental Virus Infection was established.
1981 March	Construction of extension of the main building was completed. Thus the main building now constitutes five floors with a basement occupying the aggregate area of 5,410m ² .

The major part (ca. 481m²) of the extended area serves for researches involving radioisotope labelling and in vitro DNA recombination experiments requiring the P3 facilities.

- 1986 May The memorial events for the 30th anniversary of foundation of this Institute were held on May 16-17.
- 1986 November Professor Yorio Hinuma was honoured as "Person of Cultural Merits (Bunkakorosha)"
- 1987 May Department of Biophysics and Department of Tumor Virology were reorganized to form Department of Viral Oncology which consists of 4 Laboratories.
- 1988 April Virological Diagnosis Center was reorganized to become Research Center for Immunodeficiency Virus which consists of Laboratory for AIDS Immunology and Laboratory of Viral Pathogenesis.
- 1989 April Department of Biochemistry and Department of Genetics were reorganized to form Department of Genetics and Molecular Biology which consists of 3 Laboratories.
- 1990 March Construction of a new building was partly completed.
- 1990 April Department of Pathology and Department of Molecular and Cellular Virology were reorganized to form Department of Cell Biology which consists of 3 Laboratories, while Department of Serology and Immunology, Department of Prevention and Therapeutics and Department of Neurological Virus Disease were reorganized to form Department of Biological Responses which consists of 2 laboratories and one for visiting staff.
- 1992 April Laboratory of Regulatory Information was established within the Department of Cell Biology to host a visiting professor as well as a research group.
- 1993 December Construction of the new building which accommodates three laboratories from this Institute as well as some from the Medical School and the Center for Molecular Biology and Genetics of the University was completed.
- 1994 October Construction of a new animal facility with some laboratories was completed.
- 1998 April One staff member was appointed academic staff of the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, and students of the school were first admitted to the Institute.
- 1998 April Research Center for Immunodeficiency Virus was reorganized to become Research Center for Acquired Immunodeficiency Syndrome.
- 1998 April Laboratory of Virus Control in Research Center for Immunodeficiency Virus was established as such that Visiting Staff be appointed.
- 1999 April Several staff members were appointed academic staff of the Graduate School of Biostudies, and students of the school were first admitted to the Institute.

2002 April	The Experimental Research Center for Infected Animals was abolished and the Experimental Research Center for Infectious Diseases was established instead.
2005 April	Research Center for Emerging Virus was established.
2009 June	The Institute commenced service as a Joint Usage / Research Center for fusion of advanced technologies and innovative approaches to viral infections and life science.
2010 April	Center for Acquired Immunodeficiency Syndrome Research was reorganized to become Center for Human Retrovirus Research.
2010 April	Research Center for Emerging Virus was reorganized to become Center for Emerging Virus Research.
2013 October	Laboratory of Evolutional Virology was established in Experimental Research Center for Infectious Diseases.

Research Activities

Laboratory of Gene Analysis

I. First Group

Members

Professor	Yoshinori Akiyama
Associate Professor	Hiroyuki Mori
Assistant Professor (Spe.)	Yohei Hizukuri (Center for Emerging Virus Research)
Research Fellow	Eiji Ishii Natsuko Tanaka
Graduate Student	Tokuya Hattori, Yasushi Daimon, Ryoji Miyazaki, Koichiro Akiyama, Kazuya Mito, Shinya Mizuno, Akira Mukuno, Sohei Sakashita

Introduction

The research projects carried out in this group are concerned with post-translational events in the expression of genetic information. Specifically, processes of protein translation, protein translocation across and integration into the membrane, membrane protein proteolysis and extracytoplasmic stress responses are investigated by combined molecular genetic, biochemical biophysical and structural approaches.

Topics

1) Roles of the membrane-reentrant β -hairpin-like loop of intramembrane cleaving protease RseP in selective substrate binding and cleavage: K. AKIYAMA, S. MIZUNO, Y. HIZUKURI, H. MORI, T. NOGI¹, and Y. AKIYAMA (¹Yokohama City Univ.)

Regulated intramembrane proteolysis (RIP) provides a widespread mechanism for transmembrane signaling and acts in many important cellular processes in organisms ranging from prokaryotes to higher eukaryotes. *Escherichia coli* RseP, a member of the S2P family of intramembrane cleaving proteases involved in RIP, plays a critical role in the extracytoplasmic stress response through cleavage of the transmembrane segment of the anti- σ^E membrane protein, RseA. While RseP catalyzes proteolysis of RseA and other substrate proteins within the membrane, the molecular mechanism of substrate recognition and cleavage remains elusive. The crystal structure of an archaeal S2P protease (mjS2P) revealed that mjS2P possesses a region that is looped into the membrane domain as a β -hairpin-like structure from the cytoplasmic side in the vicinity of the proteolytic active site. This membrane-reentrant loop region is conserved among subfamilies of

the S2P proteases. We examined the functional roles of this loop region. Our results show that: (1) Mutations in the C-terminal part of the loop, which would disturb the possible β -strand conformation, impaired the proteolytic function of RseP and some of them exerted differential effects on the cleavage of different substrates; (2) The C-terminal part of the loop directly interacts with the substrate's transmembrane segment; (3) Helix-destabilizing mutations in the substrate's transmembrane segment suppressed the defects caused by the loop mutations in an allele-specific manner. We propose that the membrane-reentrant loop promotes substrate cleavage by selectively binding a substrate in an extended conformation and presenting it to the proteolytic active site, which contributes to substrate discrimination by RseP.

2) Functional analysis of YfgM identified as a SecG-proximal protein: N. TANAKA, G. KOBAYASHI, N. DOHMAE¹, T. SUZUKI¹, K. ITO², Y. AKIYAMA and H. MORI. (¹RIKEN, ²Kyoto Sangyo University)

In bacteria, SecA ATPase and SecY/E/G translocon play central roles in protein export across the cytoplasmic membrane. In addition to these core components, a membrane protein complex SecD/F accelerates the export process by utilizing the proton-motive force across the membrane. By systematic site-directed *in vivo* photocrosslinking¹⁾ analysis targeted to SecG, we found previously that YfgM, an inner membrane protein of unknown function, resides in close proximity to SecG. Recently (three decades after the discovery of SecY), a report appeared that YfgM is indeed an ancillary subunit of the SecYEG translocon²⁾, but its function is still largely unknown. Our initial attempts to address phenotypes of the chromosomal *yfgM* deletion met some complication presumably due to a polarity effect on the expression of downstream genes. To overcome this complexity and facilitate functional characterization of YfgM, we then altered the transmembrane segment of YfgM by a localized frame-shifting. This minimum change in the chromosomal base sequence abolished the membrane anchoring of YfgM but did not affect the expression of the neighboring genes. The resulting *yfgM* allele (*yfgM*^{sol}), encoding a soluble and presumably inactive form of YfgM, was found to rescue the growth and protein export defects of the *secDI* mutation, which virtually eliminates the production of the SecD/F complex. Since the phenotype was complemented by the expression of wild-type *yfgM* in *trans*, it was due to a loss of the YfgM function. In other words, YfgM exerts a negative effect on growth of cells with limited SecD/F. While further studies are necessary to address the underlying molecular mechanisms, these findings suggest that YfgM cooperates with other Sec subunits to control the functionality of the SecYEG-DF machinery of protein export.

1) Chin, J. W. *et al.* (2002) Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 99, 11020-11024.

2) Götzke, H. *et al.* (2014) YfgM is an ancillary subunit of the SecYEG translocon in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** 289, 19089-19097.

3) Lethality caused by the loss of σ^E is suppressed by the activation of TA system toxins in *Escherichia coli*: Y. DAIMON, S. NARITA¹ and Y. AKIYAMA (¹University of Morioka)

σ^E , an alternative σ factor that governs a major signaling pathway in envelope stress responses in gram-negative bacteria, is essential for growth of *Escherichia coli* not only under stressful conditions such as elevated temperature, but also under normal laboratory conditions. A mutational inactivation of the *hicB* gene has been reported to suppress the lethality caused by the loss of σ^E ¹⁾. *hicB* encodes the antitoxin of the HicA-HicB toxin-antitoxin (TA) system; overexpression of the HicA toxin, which exhibits mRNA interferase activity, causes cleavage of mRNAs and arrest of cell growth, while simultaneous expression of HicB neutralizes the toxic effects of HicA²⁾. To date, however, how the loss of HicB rescues the cell lethality in the absence of σ^E , and more specifically whether HicA is involved in this process, remain unknown. We showed that simultaneous disruption of *hicA* abolished suppression of the σ^E essentiality in the absence of *hicB*, while ectopic expression of wild-type HicA, but not that of its mutant forms without mRNA interferase activity, restored the suppression. Furthermore, HicA and two other mRNA interferase toxins, HigB and YafQ, suppressed the σ^E essentiality even in the presence of chromosomally-encoded cognate antitoxins when individually overexpressed. Interestingly, when the growth media were supplemented with a low level of antibiotics that are known to activate toxins, *E. coli* cells with no suppressor mutation grew independently of σ^E . Taken together, our results indicate that the activation of TA system toxins can suppress σ^E essentiality and affect the extracytoplasmic stress responses.

1) Button. J. E. *et al.* (2007) A suppressor of cell death caused by the loss of σ^E downregulates extracytoplasmic stress responses and outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 189, 1523-1530.

2) Jørgensen, M. G. *et al.* (2009) HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. **J. Bacteriol.** 191, 1191-1199.

List of Publications

Kumazaki, K., Kishimoto, T., Furukawa, A., Mori, H., Tanaka, Y., Dohmae, N., Ishitani, R., Tsukazaki, T., and Nureki, O. (2014) Crystal structure of *Escherichia coli* YidC, a membrane protein chaperone and insertase. **Sci. Rep.** 4, 7299.

Kumazaki, K., Chiba, S., Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K.-I., Sugano, Y., Mori, T., Dohmae, N., Hirata, K., Nakada-Nakura, Y., Maturana, A.D, Tanaka, Y., Mori, H., Sugita, Y., Arisaka, F., Ito, K., Ishitani, R., Tsukazaki, T., and Nureki, O. (2014) Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. **Nature**, 509, 516-520.

Mio, M., Tsukazaki, T., Mori, H., Kawata, M., Moriya, T., Sasaki, Y., Ishitani, R., Ito, K., Nureki, O. and Sato, C. (2014) Conformational variation of the translocon enhancing chaperone SecDF. **J. Struct. Funct. Genomics**, 15, 107-115

Arolas, J. L., García-Castellanos, R., Goulas, T., Akiyama, Y. and Gomis-Rüth, F. X. (2014) Expression and purification of integral membrane metallopeptidase HtpX. **Protein Expr. Purif.**, 99C, 113-118.

Hizukuri, Y., Oda, T., Tabata, S., Tamura-Kawakami, K., Oi, R., Sato, M., Takagi, J., Akiyama, Y., and Nogi, T. (2014) A structure-based model of substrate discrimination by a non-canonical PDZ tandem in the intramembrane-cleaving protease RseP. **Structure**, 22, 1326-336.

秋山芳展（2014）細菌表層ストレス応答システムの新機能の解明 **IFO Res. Commun.** 28, 51-69.

Hizukuri, Y., Oda, T., Tabata, S., Tamura-Kawakami, K., Oi, R., Sato, M., Takagi, J., Akiyama, Y., and Nogi, T.: Substrate discrimination by size-exclusion in the intramembrane protease RseP. IUCr 2014 - 23rd Congress and General Assembly, Montreal, Canada, 5-12 August, 2014.

Miyazaki, R., Yura, T., Suzuki, T., Dohmae, N., Mori, H., and Akiyama, Y.: Mechanism of membrane targeting-mediated regulation of the E. coli heat shock factor σ^{32} . The 12th International Student Seminar, Kyoto, Japan, 17-20 February, 2014.

秋山芳展：膜内部でのタンパク質切断による表層ストレス応答制御機構、分子遺伝学シンポジウム「新しい生命像を導いた大腸菌遺伝学の系譜」、京都、2014年3月1日

森 博幸：分泌タンパク質 VemP の翻訳停止と共役した V.SecD2 の発現上昇、2013 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの細胞構築・運動・増殖機構の研究」、三島、2014 年 3 月 25-26 日

檜作洋平、秋山芳展：膜内切断プロテアーゼ RseP による大腸菌 σ^E 経路表層ストレス応答の制御機構、2013 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの細胞構築・運動・増殖機構の研究」、三島、2014 年 3 月 25-26 日

秋山芳展：細菌表層ストレス応答システムの新機能の解明、発酵研究所第 8 回助成研究報告会、豊中、2014 年 6 月 5 日

秋山芳展、森 博幸：細菌表層タンパク質の機能発現と秩序維持機能、シンポジウム「分子から生

命へ」、京都、2014 年 7 月 26 日

石井英治、橋本成祐、千葉志信、小嶋誠司、本間道夫、伊藤維昭、秋山芳展、森 博幸：海洋性ビブリオ菌におけるタンパク質分泌不全時の救済機構、第 11 回 21 世紀大腸菌研究会、盛岡、2014 年 6 月 5-6 日

宮崎亮次、由良 隆、鈴木健裕、堂前 直、森 博幸、秋山芳展：熱ショック転写因子 σ^{32} の膜への輸送を介した機能制御機構、第 11 回 21 世紀大腸菌研究会、盛岡、2014 年 6 月 5-6 日

大門康志、成田新一郎、秋山芳展：大腸菌細胞表層ストレス応答転写因子 σ^E の生育必須性は TA システムにおける toxin の活性化により解消される、第 11 回 21 世紀大腸菌研究会、盛岡、2014 年 6 月 5-6 日

秋山光市郎、水野慎也、檜作洋平、禾 晃和、森 博幸、秋山芳展：S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP の膜内挿入ループ領域の機能解析、第 11 回 21 世紀大腸菌研究会、盛岡、2014 年 6 月 5-6 日

Ishii, E., Hashimoto, N., Chiba, S., Kojima, S., Homma, M., Ito, K., Akiyama Y., and Mori, H.: The mode of expression and physiological roles of SecDF paralogs, protein translocation enhancing factors, in *Vibrio alginolyticus*、第 9 回研究所ネットワーク国際シンポジウム、大阪、2014 年 6 月 19-20 日

秋山光市郎、水野慎也、檜作洋平、禾 晃和、森 博幸、秋山芳展：大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の保存された膜内挿入ループ領域の機能解析、第 14 回日本蛋白質科学会年会、横浜、2014 年 6 月 25-27 日

檜作洋平、小田 隆、田畑早苗、川上 - 田村恵子、大井里香、佐藤 衛、高木淳一、禾 晃和、秋山芳展：細菌表層ストレス応答制御に関わる膜内切断プロテアーゼ RseP のタンデム PDZ ドメインによる切断基質選別機構の解析、第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月 15-18 日

石井英治、橋本成祐、千葉志信、小嶋誠司、本間道夫、伊藤維昭、秋山芳展、森 博幸：*Vibrio alginolyticus* が持つ駆動力の異なるタンパク質分泌促進因子の生理的機能分担と発現制御機構、第 48 回腸炎ビブリオシンポジウム、函館、2014 年 11 月 13-14 日

II. Second Group

Members

Associate Professor

Hiroyuki Sakai

Assistant Professor

Shin-ichi Yanagawa

Topics

1) Analysis of Keratin-Associated Protein 13-Induced Activation of Canonical Wnt Signaling Pathway in vivo: S. YANAGAWA

I found that Keratin associated protein (Krtap) 13 binds to cytoplasmic portion of LRP6, a co-receptor for Wnt. Surprisingly, Krtap13 overexpression markedly stimulates Wnt signaling. Krtap13 was found to induce co-clustering of LRP6 and Dvls, thereby inhibiting Axin mediated b-catenin destruction complex that leads to activation of Wnt signaling.

To analyze effect of ectopic overexpression of Krtap13 *in vivo*, I generated a Krtap13-trans-gene (Krtap13-Tg) consisting of CAG-promoter, loxp-polyA-loxp cassette, and 3XFLAG-tagged human Krtap13 cDNA and transgenic mouse lines carrying this Tg were established. This Krtap13-Tg can express Krtap13 only after Cre-induced recombination of Tg. By crossing these Krtap13-Tg mice with another transgenic mice that express Cre in a tissue-specific way, I generated a mice system that allowed tissue specific overexpression of Krtap13. Twenty-five% of mice born from crossing between Krtap13-Tg mice and CAG-Cre-Tg mice developed Lymphoma/ Leukemia 1~1.5 year after birth. Lymphoma/ Leukemia cell typing analyses using FACS are underway.

2) Identification of Novel Function of Human Papillomavirus E4: H. SAKAI

HPV infection begins in the basal cells of the epithelium, and as these cells divide, differentiate, and migrate toward the surface of the epithelium, the virus is able to complete its life cycle. The viral life cycle depends on the differentiation of the epithelium, but how the life cycle is controlled is not well understood. It is interesting that although viral oncoproteins cause the increase of cellular proliferation and/or transformation, terminally cellular differentiation of epithelium is required for completion of the viral life cycle.

The expression of E1^{E4} occurs in the upper layers of the HPV-infected epithelium, coordinating with the onset of viral genome amplification and the expression of viral late genes. It is known that E1^{E4} disrupts the keratin networks. It is also known that E1^{E4} induces G₂/M cell cycle arrest. But it is yet to be known well about the details of E1^{E4}. To investigate novel functions of E1^{E4}, we performed yeast two-hybrid

assays and got several candidate proteins as which interacts with E1^{E4}. As the results, it is suggested that E1^{E4} associates with the Aggresome compartment that is one of cellular inclusion body systems. In the future, we will ascertain the function of E1^{E4} and its involvement in the viral life cycle.

3) Analysis of CAF formation mechanism using HPV positive cells: H. SAKAI

In many reports, the importance of the interaction between the cancer stem cells and the microenvironments has been indicated. In the previous studies, it was suggested that HPV E6, E7, c-Myc, and H-ras were the key factors for the establishment of the cancer stem cell in the cervical cancer. These factors might alter the microenvironment to be favorable for cancer development. To examine the effect of the cancer cells in fostering the cancer-associated fibroblasts (CAFs), HPV-positive cancer cells, SiHa, HeLa, and Caski, were applied to the organotypic raft culture, and the effects on the fibroblasts were analyzed by gene-expression profiling. The expressions of CD44 and α -SMA were used as the markers for the CAF induction. In another experiment, the fibroblasts expressing an oncogene, *myc*, *src*, or *ras* were used as the transformed fibroblasts, and normal HFKs or HeLa cells were overlaid on these cells. The effect of TGF β produced by CAFs on the EMT of normal and HPV-positive keratinocytes was also examined. These inter-cellular communications might be important for the progression of the cervical cancer.

List of Publications

Yamamoto, M., Onogi, H., Kii, I., Yoshida, S., Iida, K., Sakai, H., Abe, M., Tsubota, T., Ito, N., Hosoya, T. and Hagiwara, M. (2014) CDK9 inhibitor FIT-039 prevents replication of multiple DNA viruses. **J. Clin. Invest.** 124, 3479-3488.

酒井博幸、梶谷直子、佐塚文乃：HPV複製におけるウイルス遺伝子機能の解析．第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014年9月25-27日

山本 誠、小野木 博、酒井 博幸、吉田 優、細谷 孝充、萩原 正敏：宿主リン酸化酵素を標的とした次世代抗ウイルス薬の開発、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10-12日

酒井 博幸、梶谷 直子、佐塚 文乃：重層上皮組織におけるHPV複製機構の解析、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10-12日

I. First Group

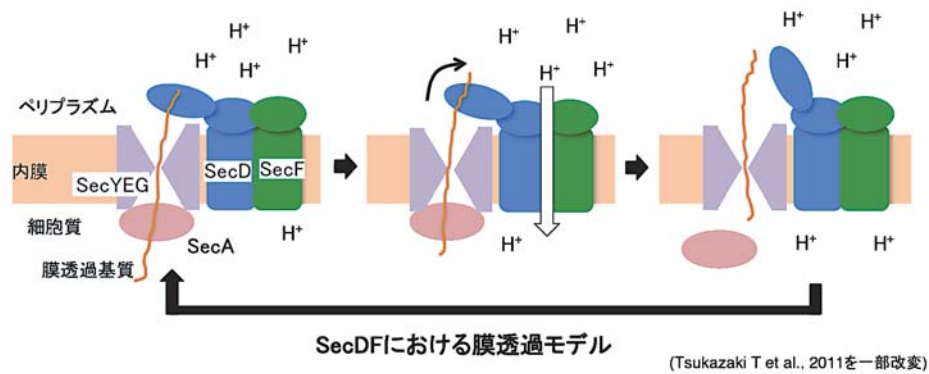
教授	秋山芳展
准教授	森 博幸
特定助教	檜作洋平（新興ウイルス研究センター）
研究員	石井英治 田中夏子
大学院生	服部徳哉、大門康志、宮崎亮次、秋山光市郎、三登一八、水野慎也、 棕野翠、坂下宗平

本年は、理学研究科大学院生（M1）として坂下宗平さんが、博士研究員（研修員）として田中夏子さんが新たに加わり、一方、橋本成祐さん、舩井千草さんが修士課程を終了し就職のため研究室を去りました。また、附属新興ウイルス研究センター特定助教の檜作洋平博士と引き続き密接な協力の下に研究を行っています。

1) 部位特異的 *in vivo* 光架橋法による膜透過促進因子 SecD と SecF 間のペリプラズム領域における近接部位の同定と構造変化の解析

生物において、細胞質内で合成されたタンパク質のうち細胞外で機能するものは、生体膜を透過する必要があります。タンパク質膜透過には、進化上保存されたタンパク質膜透過装置が関わっています。大腸菌においては、主にタンパク質の通り道となる SecYEG トランスロコン、膜透過の駆動モーターとして働く SecA ATPase、そしてタンパク質の膜透過を促進する SecDF 複合体が関わっています。

高度好熱菌由来の SecDF の結晶構造解析と生化学的解析から、当研究室では「SecDF は、プロトンの細胞内への流入と共役した SecD-SecF インターフェイス領域の構造変化を介し、タンパク質の膜透過を促進する」というモデルを提唱しています（図参照）。結晶構造上、特にペリプラズム領域側近くの膜貫通領域 SecD-SecF 相互作用面にはプロトンが透過可能な隙間は存在しないものの、近年報告された電子顕微鏡による SecDF の構造解析においては、SecD-SecF 間のペリプラズム側領域が開いた状態で存在しうることが報告されています。しかし、生細胞内においても SecD-SecF 間でそのような構造変化が起きているのかは、未だ解っていません。そこで、大腸菌 SecDF を用いて、SecD と SecF 間のペリプラズム領域での近接部位を調べるとともに、プロトンの移動に共役し



た構造変化について検討を行いました。

SecDF の結晶構造上、ペリプラズム領域の SecD-SecF 間で近接しているアミノ酸残基に対応する大腸菌 SecDF のアミノ酸残基に、光反応性アミノ酸アナログ *p*-benzoyl-L-phenylalanine (pBPA) を部位特異的に導入した変異型 SecDF 36 種類を用いて、*in vivo* 光架橋実験を行いました。その結果、11 種類の変異型 SecDF で SecD-SecF 間の架橋複合体が確認されました。さらに、SecD の T266 と SecF の G111 の両アミノ酸残基を Cys に置換したところ、両 Cys 残基間で半定量的なジスルフィド結合の形成が確認されました。これらの結果から、生細胞内においても SecDF は結晶構造と類似した構造を取りうることを示唆されました。また、光架橋複合体の形成効率の変化を指標に、プロトン流入と SecDF の構造変化を検討しました。具体的には、(1) プロトンの膜透過を損なう SecD (D519N) 変異の導入、あるいは (2) プロトンイオノフォア CCCP 添加の架橋形成に及ぼす効果を検討しました。その結果、pBPA 導入部位により結果は異なるものの、プロトン透過能を阻害することにより、架橋複合体の形成効率の増加または減少が確認されました。これらの結果は、「プロトンの細胞内への流入と共役して、SecD-SecF インターフェース領域の構造変化が起きている」というモデルを支持するものと考えています。(棕野、秋山、森)

II. Second Group

准教授	酒井博幸
助教	柳川伸一

本年度はスタッフの酒井、柳川、それに加えてサポートスタッフとして、工学部の坂口くんが参加してくれています。

1) HPV 生活環とウイルス発がん機構の解明

HPV 感染症は代表的な STD (Sexually Transmitted Disease: 性感染症) であり、広く蔓延している

ことが知られています。また近年ではその感染が若年層に広がっていることが問題となっています。HPV 感染は発がんに関連することが知られていて、特に子宮頸癌では、ほとんどの発症例で HPV の感染が確認されており、HPV 感染が子宮頸癌発症の主要なリスクファクターであると考えられています。HPV 感染によるがん化を防ぐためには、HPV の感染・複製を抑制することが効果的であると考えられます。しかし HPV の複製・遺伝子発現の制御は、上皮細胞の分化に強く依存していて、通常の組織培養では HPV の生活環を再現できないので、これまでその制御機構はほとんど分かっていませんでした。私たちは既に皮膚モデル培養系を用いて、HPV の複製を組織培養下で再現しています。この系をさらに発展させるべく、独自の HPV レプリコンを構築し、効率よく HPV の複製・遺伝子発現機構を解析する手法を検討しています。(酒井)

2) LRP6 結合蛋白 Krtap13 による Wnt シグナル伝達経路活性化のマウス個体での解析

柳川は、Wnt の Co-receptor である一回膜貫通型蛋白 LRP6 の細胞質ドメインに結合する蛋白として、Keratin associated protein 13 (Krtap13) を、見いだした。

Wnt 非存在下、Krtap13 を強制発現させるだけで、Wnt 経路の著しい活性化が生じた。Krtap13 は、細胞膜上で、LRP6 および Dvl と共に凝集体を形成するが、それは、通常の Wnt 経路を活性化の際に生じる LRP6 Signalosome の代わりをしていると考えられた。

Krtap13 による Wnt 経路の活性化が与える影響を、in vivo で解析する為、公汎な組織での発現が可能な CAG プロモーターとヒト Krtap13 の cDNA の間に lox-polyA-lox 配列を挿入した Trans gene (Tg) を作成した。この Tg マウスと種々の Cre マウスを交配する事より、recombinant Tg (R-Tg) 生じさせ、組織特異的に Krtap13 高発現させる事が出来た。CAG-Cre マウスとの交配によっては、R-Tg を持つマウスは、5%しか誕生しなかったが、そのうちの 25%のマウスは、24 ~ 39 週齢を経ると、悪性リンパ腫／白血病を発症した。名古屋大学 生体反応病理学の豊国先生に協力頂き解析中である。(柳川)

Laboratory of Cell Regulation

Members

Professor	Masahiko Sugita
Assistant Professor	Daisuke Morita Tatsuaki Mizutani
Graduate Student	Yuki Hattori, Satoru Murata, Yukie Yamamoto, Ayumi Miyamoto, Takeharu Watanabe, Yoshiharu Takama, Yuya Yoshioka

Introduction

Presentation of protein-derived peptide antigens (Ags) by major histocompatibility complex (MHC)-encoded class I and class II molecules has been a central dogma in modern immunology. Peptide Ags bound to MHC molecules are recognized by T cells bearing $\alpha\beta$ T-cell receptors (TCRs). However, the paradigm that Ag-specific T cell activation only involved recognition of peptide Ags turned out to be incorrect. T cells bearing $\alpha\beta$ TCRs are now known to recognize lipid Ags in a group 1 CD1 (CD1a, -b, and -c)-dependent manner. Thus, the Ag-specific adaptive immune system comprises two separate pathways, one directed against peptide Ags (mediated by MHC molecules) and the other directed against lipid Ags (mediated by group 1 CD1 molecules). These two pathways function cooperatively to achieve highest levels of Ag-specific host defense.

Both MHC and CD1 pathways are equally important; however, only several laboratories, including ours, appear to focus intensely on the latter pathway. This is primarily due to the fact that mice and rats that are highly useful for immunological studies have deleted genes for group 1 CD1 family, and thus, lack the lipid recognition system that is comparable to that in humans. Therefore, we have attempted to develop three distinct but complementary animal models; namely, human CD1 transgenic (Tg) mice, guinea pigs, and rhesus monkeys. The human *CD1A* genome-Tg mice were established, in which the two major cell types, immature thymocytes and epidermal Langerhans cells, specifically expressed human CD1a proteins. Alternatively, we found guinea pigs invaluable for lipid immunity research as the animals have evolved the CD1 system that is equivalent to that in humans. Finally, our laboratory has made enormous efforts to set up lipid immunity research using non-human primates, such as rhesus macaques. As described below, rhesus monkeys have now been analyzed extensively in our laboratory for lipid immunity to mycobacteria and SIV, resulting in identification of lipid-based vaccine candidates against tuberculosis and discovery of viral lipopeptide-specific CTL responses.

Topics

1) Lipid-specific innate and adaptive immunity in tuberculosis: A. MIYAMOTO, Y. WATANABE, S. MURATA, Y. HATTORI, T. MIZUTANI, D. MORITA and M. SUGITA

Mycobacteria, such as *Mycobacterium tuberculosis*, possess highly lipid-rich cell walls that are critical not simply for their acid-fast properties but also their survival and replication. The cell wall contains mycolic acids (MAs), an α -alkyl- β -hydroxy fatty acid with extremely long carbon chains ($\sim C_{80}$), which are densely aligned in covalent association with the underlying arabinogalactan sugar layer. Arabinogalactan-linked MAs extend outward and interact non-covalently with carbon chains of the surface exposed mycolyl lipids, such as trehalose 6, 6'-dimycolate (TDM), thereby forming the hydrophobic cell wall architecture that is unique to mycobacteria.

For the past several years, we studied the acquired aspect of immune responses directed against mycolyl lipids, resulting in identification of host protective T cells that existed in humans, but not in mice (*J. Biol. Chem.* **283**: 28835-28841, 2008; *J. Biol. Chem.* **286**: 16800-16806, 2011; *Infect. Immun.* **81**: 311-316, 2013). We now noted unexpectedly that innate immune responses to mycolyl lipids also differed significantly between the two species. An array of mycolyl lipids has been studied extensively, and their innate immunity-stimulating activities have been determined at cellular and molecular levels; however, glycerol monomycolate was an important exception despite its apparent relevance to chronic tuberculosis. We showed that glycerol monomycolate functioned as a potent ligand for human macrophage inducible C-type lectin, Mincle (*J. Biol. Chem.* **289**: 15405-15412, 2014). Although the ectodomain sequences are highly conserved between human and mouse Mincle, the latter totally failed to recognize glycerol monomycolate. The differential recognition of glycerol monomycolate by human and mouse Mincle was further substantiated by generation of human Mincle transgenic mice. In these mice, local recruitment of eosinophils was prominent at the site of injection with glycerol monomycolate, and such tissue responses were not elicited in wild-type mice expressing mouse Mincle. Therefore, these observations underscore a role for glycerol monomycolate and its recognition by human Mincle in eosinophilic responses that are often observed in chronic tuberculosis.

2) Lipopeptide-specific immunity in AIDS: D. MORITA, Y. YAMAMOTO, Y. YOSHIOKA, Y. TAKAMA, T. MIZUTANI and M. SUGITA

By taking full advantage of IVR's superb research environments, we are encouraged to address a naive question as to how lipid immunity functions in host defense against viral infections as viruses do not express their own lipids. Given that some of the viral proteins require modification with host-derived fatty acids for their critical functions, we hypothesized that the host immunity might be able to detect lipidated viral proteins (lipoproteins). Indeed, we found that rhesus macaque monkeys infected with the simian immunodeficiency virus (SIV) mounted cytotoxic T lymphocyte responses to N-myristoylated SIV Nef 5-mer lipopeptide

(C14nef5) (*J. Immunol.* **187**: 608-612, 2011). Functional studies with C14nef5-derived structural analogues revealed that the putative lipopeptide Ag-presenting molecule might have two separate Ag-binding sites, one for interaction with a C₁₄ saturated acyl chain and the other for anchorage of the C-terminal serine residues (*J. Virol.* **87**: 482-488, 2013). We have now determined the molecular identity and completed X-ray crystallographic analysis (**unpublished**).

List of Publications

Hattori, Y., Morita, D., Fujiwara, N., Mori, D., Nakamura, T., Harashima, H., Yamasaki, S., Sugita, M. (2014). Glycerol monomycolate is a novel ligand for the human, but not mouse macrophage inducible C-type lectin, Mincle. *J Biol Chem.* 289, 15405-15412.

杉田昌彦、宮本歩己（2014）ミコール酸糖脂質を標的とした CD1 依存的 T 細胞応答：THE LUNG perspectives 22、73-76.

吉岡佑弥、杉田昌彦（2014）脂質免疫を基盤にした新しい遅延型アレルギー応答：臨床免疫・アレルギー科 62、692-696.

Hattori, Y.: “Differential recognition of glycerol monomycolate, a chronic tuberculosis-associated mycobacterial lipid, by human and mouse Mincle” , The 21st East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Seoul, Korea, 17-18 July, 2014.

水谷龍明, Nina, N., Eva, P.M., Veronika, S., Dagmar, S. The role of Type I IFN signaling for NK cell activation in tumor surveillance. 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月26日

教授	杉田昌彦
助教	森田大輔
特定助教	水谷龍明
大学院生	服部祐季、邑田悟、山本侑枝、宮本歩己、渡邊丈治、高間義晴、 吉岡佑弥

脂質免疫研究の黎明期に、杉田がヒト CD1 分子の研究成果を *Science* 誌に発表したのは今から 20 年近くも前、1996 年のことである。以降、CD1 分子の細胞生物学的特質と結核菌脂質の特性について理解を深めながら、脂質免疫の切り口から結核免疫の研究に取り組んできた。当初はヒト培養細胞の解析が主体であったが、ウイルス研究所着任（2004 年）以降、動物モデルとしてモルモット、ヒト CD1 遺伝子導入トランスジェニックマウス、アカゲザルを開拓し、種々の抗体やテトラマーなどの解析ツールを独自に開発して着実に歩んできた。とりわけ結核菌の identity を規定する物質「ミコール酸」に着目し、その代謝経路と免疫認識機構の研究を世界に先駆けて展開してきた。この CD1・脂質免疫研究の「世界」は、しかしながら小さい。タンパク質に対する MHC 依存性免疫経路（図左）と双璧をなす獲得免疫機構であるにもかかわらず、脂質に対する CD1 依存性免疫経路（図中央）の研究者人口は少ない。以前にも述べたが、その理由は大きく 2 つある。ひとつは免疫学者の多くは水に溶ける物質に親和性があること。ミコール酸は他の生物には類を見ない極長鎖脂肪酸（炭素数が 80 を越えるアシル鎖を有する）であり、高度の疎水性を有する物質である。どうやって培養系に持ち込むのか、どうやって生体組織に接種するのか、ノウハウが必要となる。そして、免疫学研究でもっともポピュラーな動物＜マウスとラット＞にこのヒト脂質免疫系に相当するシステムが存在しない。したがって免疫研究の対象となり難いのである。しかし結核病理を考えたとき、マウスとヒトでは大きく異なるのはよく知られた事実である。研究を進めるにつれ、マウスとヒトの免疫系の基本的な違いに気付くことが、とりわけ最近多くなってきた。これまでのマウスを用いた結核研究では見えなかったことが、次第に見えつつあるのだと思う。

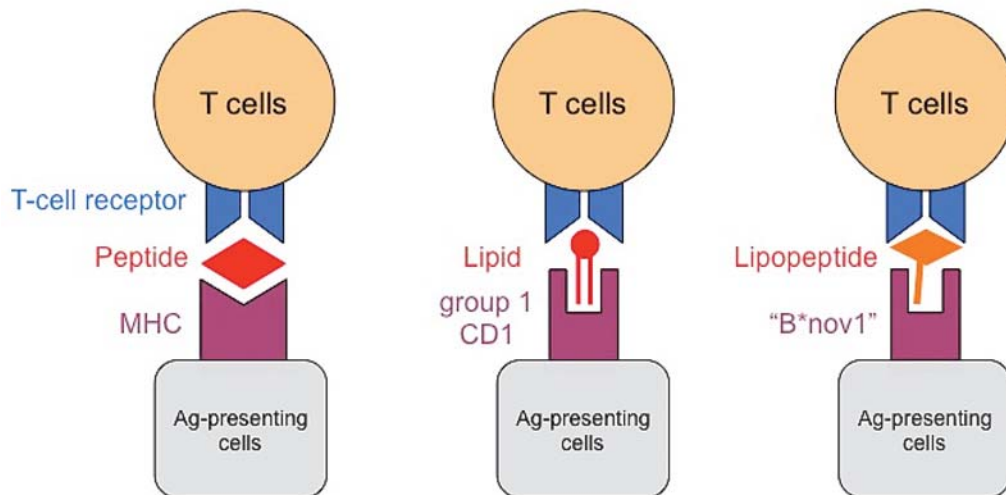
今年、結核菌脂質リガンドに対する自然免疫の研究において、ひとつの進展があった。マクロファージ等の自然免疫細胞に発現するヒト C 型レクチン受容体「Mincle」が、結核菌脂質グリセロールモノミコール酸を認識することを実証した。興味深いことにマウス Mincle はヒト Mincle と高い相同性を有するにも関わらず、グリセロールモノミコール酸を認識しない。いろいろな過去の

報告や状況証拠から、グリセロールモノミコール酸はおそらく慢性炎症に深く関わる脂質であろうと推察している。古くから語られてきたヒトとマウスの慢性結核病態の違いが Mincle によるグリセロールモノミコール酸の認識の有無で説明できるのだろうか。いま大学院生の邑田悟医師が、ヒト Mincle トランスジェニックマウスを用いて精力的に研究を進めている。またこれとは別に、脂質免疫を切り口とした結核免疫研究の 1 つの目標は、抗結核「脂質ワクチン」の開発である。新たなワクチンパラダイムの創成にもつながる大事業だが、モルモットおよびアカゲザルを用いた研究により、かなりゴールが見えてきた。大学院生の宮本歩己さん、渡邊丈治君が地道に研究を進めてくれている。そのたゆまない努力に敬意を表したい。

さて、ウイルス研究所の一研究室として、ウイルス研究の発展に貢献したいと考えるのは当然のことである。ウイルスは固有の脂質を持たない。しかしたとえばエイズウイルス Nef タンパク質のように、脂質修飾を受けることにより機能するリポタンパク質が存在する。これに対する獲得免疫応答は存在するのだろうか。2006 年夏、この question に取り組んでくれたのが当時大学院修士 1 年であった森田大輔助教である。そして今年、8 年余りに及ぶ研究がついに開花しようとしている。まだ未公表のためここに詳しく書けないが、アカゲザルエイズモデルにおいて Nef リポペプチドに対する細胞傷害性 T 細胞の存在を実証しただけでなく、3 年をかけてリポペプチド抗原提示を担う分子（図右、B**nov1*）を同定し、さらに 2 年をかけて今年、その X 線結晶構造を決定した。その精緻な構造から新たな興味も湧き上ってくる。他のウイルスではどうなのだろう。パルミチン酸付加やゲラニルゲラニル化など、他の脂質修飾も免疫標的となるのだろうか。リポペプチドワクチンは可能か。自己・非自己の認識機構や自己免疫との関連はどうか。大学院生の山本侑枝さん、今年から新たに加わった高間義晴君、吉岡佑弥君が研究を大きく展開しつつある。

7 月より水谷龍明博士（前長崎大学助教）が特定助教として研究室に加わった。がんの病態解明や診断に向けて、最新のイメージング手法を開拓してきた新進気鋭のがん免疫研究者であり、分子生物学への造詣も深い。幅広い学識と豊かな経験、鋭い洞察から結核慢性病態とがん慢性病態の共通項をあぶり出し、制御への道筋を構築しようとしている。研究室では数年前に、ヒトがん細胞の一部が CD1 分子を表出することを見いだしている。研究室として長らくの懸案であった脂質免疫のウインドウから見たがん免疫の研究が水谷助教の着任とともに始められつつある。今後の研究発展に期待していただきたい。

The notion that T cells recognize peptide antigens
is **only partially** correct.



Laboratory of Tumor Biogenesis

Members

Professor

Shin Yonehara

Assistant Professor

Akira Murakami

Introduction

Apoptosis, or programmed cell death, plays an important role in many biological processes, including embryogenesis, development of immune system, maintenance of tissue homeostasis, and elimination of virus-infected and tumor cells. We found cell surface Fas antigen (Fas), which can directly mediate apoptosis-inducing signals into cells by stimulation with agonistic anti-Fas mAbs or Fas ligand. Our main research project is to understand the intracellular signal transduction mechanism of cell death including apoptosis and caspase-independent novel types of cell death, and the biological significance/physiological role of cell death and cell death-regulating molecules. Investigations of molecular mechanisms and physiological roles of cell death are important for a better understanding of mammalian immune system, embryogenesis and tumorigenesis.

Topics

1) FLASH/casp8ap2 is indispensable for early embryogenesis but dispensable for proliferation and differentiation of ES cells: Y. MINAMIDA, M. SOMEDA and S. YONEHARA

FLICE/caspase-8-associated huge protein (FLASH)/casp8ap2 is involved in various cellular functions, such as cell cycle progression, transcriptional regulation, the regulation of apoptosis, and the regulation of histone gene expression. The down-regulated expression of FLASH has been shown to inhibit cell cycle progression in the S phase in many kinds of mice and human cell lines and the inhibition of cell cycle progression may be attributed to the suppressed expression of replication-dependent histone genes. We here demonstrated that the induced knockout of FLASH never affected cell cycle progression in ES cells, in which the expression of core histone genes was decreased to levels similar to those in human KB cells sensitive to the knockdown of FLASH. In addition, the FLASH conditional knockout ES cells could differentiate normally into not only mesodermal and endodermal cells, but also trophoblasts. In order to investigate the function of FLASH in early embryogenesis *in vivo*, we also examined a FLASH mutant mouse, in which FLASH mutant allele did not express FLASH mRNA in embryos and most adult organs, except for the testis. FLASH mutant embryos died between E3.5 and E8.5. Furthermore, the *in vitro* cultivation of FLASH mutant

embryos generated by *in vitro* fertilization showed embryonic lethality at the pre-implantation stage by inhibiting the hatching of embryos and their adherence to substrates. Taken together, these results indicate that FLASH plays an important role in early embryogenesis, but is not essential for either the proliferation or differentiation of ES cells.

2) Pathogenic Th2-type follicular helper T cells contribute to the development of lupus in Fas-deficient mice: S. FUTATSUGI-YUMIKURA, K. MATSUSHIMA, A. FUKUOKA, S. TAKAHASHI, N. YAMAMOTO, S. YONEHARA, K. NAKANISHI and T. YOSHIMOTO

Fas mutant mice are well recognized as autoimmune mouse models, which develop symptoms similar to human systemic lupus erythematosus. Although disease severity in *Fas* mutant mice is greatly affected by the genetic background, the mechanisms affecting pathological heterogeneity among different strains of *Fas* mutant mice are poorly understood. In this study, we examined the phenotypic differences between *Fas*-deficient (*Fas*^{-/-}) mice on the BALB/c and C57BL/6 backgrounds to gain insight into the etiological and pathological heterogeneity of monogenic autoimmune diseases. *Fas*^{-/-} mice on the BALB/c background (BALB/c-*Fas*^{-/-}) developed more severe autoimmune disease with high serum auto-antibodies and renal disease compared with those on the C57BL/6 background (C57BL/6-*Fas*^{-/-}). Splenic B cells were highly activated, and germinal center formation was enhanced in BALB/c-*Fas*^{-/-} but not in C57BL/6-*Fas*^{-/-} mice. Follicular helper T (T_{fh}) cells were equally abundant in the spleens from both strains of *Fas*^{-/-} mice. However, T_{fh} cells from BALB/c-*Fas*^{-/-} mice produced much higher amounts of B-cell-activating cytokines, including IL-4 and IL-10, a phenotype reminiscent of T_H2-type T_{fh} cells described in human studies. Our results revealed a qualitative difference in T_{fh} cells between the two strains of *Fas*^{-/-} mice. We propose that the pathogenic T_H2-type T_{fh} cells in BALB/c-*Fas*^{-/-} mice contribute to the excessive activation of B cells, resulting in high serum immunoglobulin levels and the severe lupus phenotype, which may account for the differential outcomes of human monogenic autoimmune diseases.

3) Novel types of programmed necrosis induced by IFN- γ in wild-type and caspase-8 KO mouse embryonic fibroblasts: S. SKAGUCHI, S. KUROKI and S. YONEHARA

After apoptosis was clarified to be executed by activated caspases, several types of caspase-independent non-apoptotic cell death were found to be induced in mammalian cells. One of the caspase-independent cell death is a type of programmed necrosis called to be necroptosis, which is induced in cells without caspase-8 activity by treatment with Tumor Necrosis Factor (TNF). Necroptosis is mediated by two kinds of cytoplasmic protein kinases, receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) and RIPK3, and inhibited by treatment with a specific inhibitor of RIPK1, necrostatin-1 (Nec-1). We found a novel type of programmed necrosis, which was induced in mouse embryonic fibroblasts from caspase-8 KO mice (C8KO MEFs) by

treatment with interferon-gamma (IFN- γ). Although this type of programmed necrosis required kinase activity of RIPK3, Nec-1 failed to inhibit the cell death, indicating that IFN- γ -induced programmed necrosis is different from RIPK1-dependent necroptosis. We also found another type of IFN- γ -induced programmed necrosis in WT MEFs in the presence of a pan-caspase inhibitor, z-VAD-fmk. In contrast to IFN- γ -induced necrosis in C8KO MEFs, this type of programmed necrosis in WT MEFs required both RIPK1 and RIPK3.

4) A role of Wnt signals in the mesodermal differentiation of mouse ES cells: A. MURAKAMI

ES cells are induced to differentiate into cells at the mesoderm lineage under culture conditions forming embryoid bodies. Among many signaling pathways or factors involved in the process, we are currently interested in a Wnt signaling pathway. An inhibitor of Wnt signals completely blocks the mesoderm induction. So far, Wnt3 and Wnt8a have been identified to play a role in the mesoderm induction through an activation of Brachyury expression, one of key factors. In addition, several other Wnt family members are expressed at earlier stages, suggesting their role in the differentiation.

From the earlier stages of the differentiation, embryoid bodies are covered with a layer of visceral endoderm. Our current hypothesis is that the visceral endoderm is induced via Wnt signals and then involved in the mesoderm induction. An inhibitor of Wnt signals, IWP-2, inhibited expression of visceral endoderm markers including Gata6, a key factor of visceral endoderm induction. Knockdown of Gata6 expression resulted in down regulation of Wnt3 and Wnt8a expression, and suppressed the mesoderm induction as well. Among the Wnt family members, Wnt1 seems to play a role in the visceral endoderm formation, as knockdown of Wnt1 expression suppressed expression of visceral endoderm markers as well as those of the mesoderm. Thus, Wnt signals seem to function at two stages of the mesoderm induction. One is for the induction of visceral endoderm and the other is for the direct induction of mesoderm through an activation of Brachyury expression.

List of Publications

Minamida Y, Someda M, and Shin Yonehara. (2014) FLASH/casp8ap2 is indispensable for early embryogenesis but dispensable for proliferation and differentiation of ES cells. **PLoS One** 9, e108032.

Futatsugi-Yumikura S, Matsushita K, Fukuoka A, Takahashi S, Yamamoto N, Yonehara S, Nakanishi K, Yoshimoto T. (2014) Pathogenic Th2-type follicular helper T cells contribute to the development of lupus in Fas-deficient mice. **Int Immunol** 26, 221-231.

米原 伸 (2014) 【編集】細胞死 Update : 基礎から臨床までを俯瞰して 別冊・医学のあゆみ.

米原 伸 (2014) はじめに 細胞死 Update : 基礎から臨床までを俯瞰して 別冊・医学のあゆみ、1.

福岡あゆみ、米原 伸 (2014) Fas で除去される新規 2 型免疫細胞と IgE 抗体産生 細胞死 Update : 基礎から臨床までを俯瞰して 別冊・医学のあゆみ、59-63.

米原 伸 : 細胞死と細胞分化のクロストーク、caspase-8 を中心として、第 23 回日本 Cell Death 学会学術集会 シンポジウム、東京、2014 年 7 月 18 日

Someda M, Kuroki S and Yonehara S: Caspase-8 regulates not only apoptotic and necrotic cell death but also retinoic acid-induced cell differentiation mediated by RIP3. The 12th International Student Seminar, Kyoto, 17-18 February, 2014.

Mori Y and Yonehara S: IFN- γ triggers RIP1/RIP3-mediated programmed necrosis in human and mouse monocyte-derived cell lines. The 12th International Student Seminar, Kyoto, 17-18 February, 2014.

Sakaguchi S, Kuroki S and Yonehara S: Analysis of the molecular mechanism of a novel type of programmed necrosis induced by interferon-gamma/IFN- γ . The 12th International Student Seminar, Kyoto, 17-18 February, 2014.

Yamamoto N, Fukuoka A, Ohshima N and Yonehara S.: Fas-expressing natural helper cell induces hyperproduction of IgE through direct interaction with B cells. The 12th International Student Seminar, Kyoto, 17-18 February, 2014.

教授 米原 伸

助教 村上 昭

当研究分野は生命科学研究科に所属しており、米原はウイルス研を兼務、村上はウイルス研所属である。准教授の酒巻和弘、助教の李慶權と大学院生は、生命科学研究科高次遺伝情報学分野の所属である。

今年の4月に、生命科学研究科の修士課程に大嶋夏美、齊藤圭亮、南美都里、松本礼美、そしてインドから Akila Ram が入学した。さらに、10月には USA から武田仁紀が生命科学研究科の修士課程に入学した。生命科学研究科修士課程を3月に修了した学生では、森勇貴が博士後期課程に進学し、山本那由は教員資格を取得するために研究生として在籍し、北瀬晶菜は就職した。研究費の経理を初めとする研究室の秘書業務は中橋直子が執り行い、研究室の円滑な運営が行われている。また、生命科学研究科とウイルス研究所が共催する国際学生セミナーの秘書として西村美穂が秋から参加し、国際学生セミナー学生実行委員会の活動を支えている。

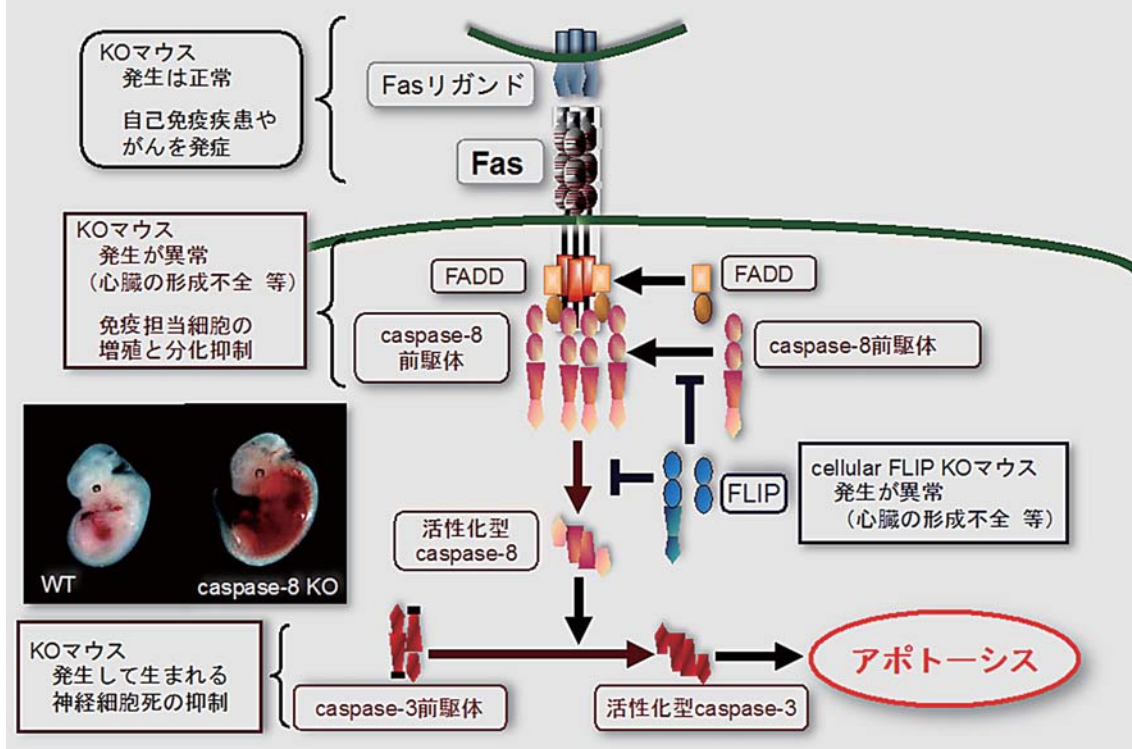
本研究分野では、米原が発見・命名したアポトーシス誘導レセプター分子 Fas の研究を出発点とし、アポトーシスやそれ以外の新しい細胞死に関する研究、細胞死関連分子の多様な生物活性に関する研究を行っている。各個人の研究内容について簡単に紹介する。

1) caspase-8 と RIP キナーゼが調節する多様な細胞死と細胞分化

Fas が媒介するアポトーシスでは、開始 caspase として caspase-8 の活性化が必要不可欠である。アポトーシスの誘導では、Fas を中心にアダプター分子である FADD と caspase-8 前駆体が DISC (death-inducing signaling complex) と呼ばれる複合体を形成する。そして、DISC の中で caspase-8 前駆体が隣接した caspase-8 前駆体を切断し活性化し、活性化した caspase-8 が下流の実行 caspase である caspase-3 の前駆体を切断・活性化し、活性化 caspase-3 が様々な細胞内の基質タンパク質 (death substrates) を切断することによってアポトーシスが実行される。

このシグナル伝達系で不可思議な現象が知られている。Fas などの Death receptor 遺伝子の KO マウスは個体発生の異常は認められないのに対し、下流の FADD や caspase-8 の KO マウスは胎生致死なのである。では、FADD や caspase-8 は Fas を介するアポトーシス以外にどのような機能を有す

FasとFas下流のシグナル分子：アポトーシスだけでなく増殖や発生・分化に関わる



るのだろうか？この長い間未解明であった疑問に対して、caspase-8 KO マウスの胎生致死という表現型が計画的ネクロシスの一種であるネクロプトーシス（caspase-8 が抑制し、腫瘍壊死因子／TNF が誘導する）に必要な RIP キナーゼ 3 (RIPK3) の KO マウスとの交配でレスキューされるという報告がなされた。これにより、caspase-8 KO マウスの胎生致死という表現型はネクロシスの亢進によると考えられるにいたっている。ところが、別の可能性を示す結果を当研究室では見いだしている。ES 細胞を用いて遺伝子の発現や発現抑制を誘導する系を構築した染田真孝は、caspase-8 の発現抑制を誘導すると分化誘導に重要なレチノイン酸シグナル伝達系が RIPK 依存的に強く増強されるという全く新しい現象を見だし、その分子機構を解明していくとともに、caspase-8 KO マウスが胎生致死となる原因がレチノイン酸シグナルの亢進なのかネクロシスの亢進なのかを明らかにすべく研究を行っている。

また、当研究室では γ 型インターフェロンが caspase-8 の発現や活性が阻害された条件下でネクロシスを誘導するという新しい系を見いだしている。この系に関して、陳建成が発現クローニング法を駆使してメカニズムの解析を行っている。また、阪口翔太は caspase-8 KO マウス由来細胞と caspase-8 の活性が阻害された細胞では、 γ 型インターフェロンがネクロシスを同じように誘導するが、その分子機構が RIPK の活性化機構とネクロシスの実行段階の両方において全く異なっていることを見だし、解析を行っている。

ヒトには caspase-8 と類似した caspaes-10 が存在するが、マウスには caspase-10 は存在しない。森勇貴は casepac-10 の発現抑制誘導系を立ち上げ、様々なヒト細胞株における効果を解析した結果、casepac-10 の発現抑制によって、多くの腫瘍由来細胞株ではアポトーシスや既知のネクローシスではない新規細胞死が誘導されるが、がん化していない細胞では細胞死は誘導されないという興味深い結果を見だし、研究を進めている。

2) 細胞周期 S 期進行に機能する巨大分子 FLASH の解析

我々が Fas シグナルとの関連で見いだした巨大分子 FLASH は、癌腫や肉腫由来細胞株の細胞周期 S 期の進行に必要不可欠であるが、正常細胞、造血系腫瘍細胞株や ES 細胞では細胞増殖に必要ではない。この細胞種の特異性を解明するために、Akila Ram は発現クローニング法を用いた責任遺伝子の同定を目指している。松本礼美は、FLASH が細胞周期特異的ヒストンバリエントの発現に関わることから、FLASH 発現抑制が細胞内のヒストンバリエントの種類を変化させることが細胞増殖制御に関連するかを解析している。加古彩華は、FLASH の発現抑制が細胞周期進行を阻害するだけでなく、未知の新規細胞死を誘導すること、RIPK 依存性ネクローシスに対する感受性を亢進することを見だし、そのメカニズムを解析している。鈴木雄太は、核移行活性を付与した FLASH の N 末端領域だけの分子が、その発現だけで細胞周期進行を阻害するというドミナントネガティブな活性を有することを、活性化誘導系を用いることにより確実に証明し、この系を用いることによって N 末端領域の他に細胞周期進行に必須の新しいドメインを見だし、研究を行っている。

3) 二核四倍体細胞に誘導される新しい細胞死

当研究室で見いだした「染色体凝縮不全→二核四倍体細胞の出現→細胞増殖の進行（染色体の不安定化を伴い、がん化の原因となる）→EF-1 α (eEF1A1) の発現低下→caspase に依存しない新しい細胞死の誘導」という現象を、様々な細胞で誘導する系をより一般化し、その分子機構と生理機能を解明するために、胡曉恬、田畑祐貴、黄達度、董晟璐と武田仁紀が研究を行っている。その中で、田畑祐貴は細胞死ではなく細胞老化が誘導される系を構築し、さらに解析した結果、既知の細胞老化ではない新しい細胞老化現象を見だし、研究を行っている。

4) B 細胞からの IgE 産生を増強させる Fas-expressing natural helper (F-NH) 細胞

当研究室では、Balb/c の遺伝的背景下の Fas KO マウスが高 IgE 産生を伴うアレルギー炎症を発症することを見だし、このマウスを用いて B 細胞からの IgE 産生を強く誘導する新しい細胞種を同定し、Fas-expressing natural helper (F-NH) 細胞と命名している。その実態と機能を明らかにするために、山本那由と大嶋夏美が F-NH 細胞の増殖機構や様々な性質の解析を行っている。

5) アポトーシス関連分子と細胞死・細胞増殖・個体発生との関係

生命科学研究科助教の李慶權は、アポトーシスと細胞増殖の相互作用や調節機能について、自らがアポトーシスとの関連で見いだした MST (*hippo*) とその下流の転写因子 YAP を中心に新たな観点から解析を行っている。生命科学研究科准教授の酒巻和弘は、様々なデータベースを駆使し caspase を進化的に理解することを行うと同時に、様々なモデル生物（メダカ、カエルなど）を用いた caspase の機能解析、数理モデルを組み込んだ caspase の活性化と生理機能の関連解析を行っている。

また、齊藤圭亮と南美都里は、当研究室で開発されたレンチウイルスベクターと shRNA 発現誘導系を用いることにより、その発現抑制を誘導すると、がん細胞特異的に細胞増殖が抑制され細胞死が誘導される分子の探索と分子機構の解析を行っている。

6) マウス初期発生における Wnt シグナルの解析

村上は、マウスの胚発生初期に、内・中・外胚葉が誘導される機構を、胚性幹細胞（ES 細胞）を用いて解析している。最近、特に、中胚葉への分化の誘導に関与している Wnt シグナルに焦点を当てている。これらの過程にどのような Wnt シグナルが如何に関与しているのかを明らかにしたいと考えている。



Laboratory of Human Tumor Viruses

I. First Group

Members

Professor	Keizo Tomonaga
Assistant Professor	Tomoyuki Honda
Project Associate Professor	Akiko Makino
Graduate Student	Kozue Sofuku, Shoko Nakamura, Yusuke Yamamoto, Shohei Kojima, Yuto Koike, Xiaoshu Ryu, Mako Yanai
Assistant Clerk	Kazumi Wakaki

Introduction

The researches carried out in this group are focused on RNA viruses, especially negative strand RNA viruses replicating in the cell nucleus, such as bornavirus and influenza virus. All our projects aim to understand the fundamental mechanisms of the replication and pathogenesis of the viruses.

Bornavirus is an enveloped non-segmented negative stranded RNA viruses belonging to the family Bornaviridae, order Mononegavirales and possesses highly neurotropic property. A mammalian bornavirus, Borna disease virus (BDV), infects many mammalian species and causes classical Borna disease, a progressive meningoencephalomyelitis, in horses and sheep. Among vertebrate RNA viruses, only two families, Bornaviridae and Orthomyxoviridae, enter the nucleus for replication and transcription. However, there is a fundamental difference between these two viruses. Bornaviruses replicate non-cytopathically and readily establish a long-lasting, persistent infection in the cell nucleus, whereas a consequence of infection by the Orthomyxoviridae is usually induction of apoptotic cell death. Thus, bornaviruses are the only known RNA viruses that can parasitize within the nuclear membrane. Therefore, understanding the life cycle of bornavirus in the nucleus would provide novel insights into the interaction between animal RNA viruses and the eukaryotic cells.

We investigated the mechanism of persistent infection of BDV in the nucleus. Recently, we found that BDV ribonucleoprotein (RNP) associates with host chromosomes throughout the cell cycles and enters the daughter cell nuclei along with mitotic chromosomes, indicating that BDV establishes a life cycle highly associated with the cellular chromosome and take advantage of chromosomal stability and dynamics to ensure the integrity of its RNP in the infected nucleus. In this year, we investigate the structure of the viral factory of BDV in the nucleus by using the ultra-resolution microscopic analyses. On the other hand, during the analysis of the interaction between BDV RNP and host chromosome, we discovered that elements homologous to the nucleoprotein (N) gene of bornavirus exist in the genomes of several mammalian species,

including humans. These sequences have been designated endogenous bornavirus-like N (EBLN) elements. In this year, we found that recombinant expression of EBLN derived from the thirteen-lined ground squirrel inhibits replication of exogenous BDV as a dominant negative mutant in the cultured human cell lines. The understanding the evolutionary and biological significances of EBLN elements in mammalian genomes is a main interest in our laboratory.

The unique virological feature of BDV indicates the ability of BDV to be a novel RNA virus vector. We have already developed BDV vectors expressing foreign proteins or small functional RNAs from the intercistronic region between the open reading frames (ORFs) encoding P and matrix (M) proteins. We improved the systems of BDV vector production from the producer cells by regulating the host factors, which can influence the production of viral virions from the cells.

In influenza virus researches, we have been investigating the early cellular response to the influenza A virus (IAV) infection. We found that the miRNAs targeting the GalNAc transferase 3 (GALNT3) mRNA are rapidly down-regulated and regulate of GALNT3 expression in the early stage of the IAV infection. Our data indicated that GALNT3 involved in not only the mucin production in the cell surface but also the viral replication in the nucleus of the infected cells.

Topics

1) Inhibition of Borna disease virus replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome: K. FUJINO, M. HORIE, T. HONDA, DK MERRIMAN and K. TOMONAGA.

Sequences derived from ancient viruses have been shown to make up a substantial part of animal genomes. Bornaviruses, a genus of nonsegmented, negative-sense RNA virus, also have left their DNA copies in the genomes of a number of vertebrate lineages. Recent studies have demonstrated that some endogenous bornavirus-like elements (EBLs) may have acquired functions in their hosts as a result of exaptation. In this study, we show that protein encoded by an EBL in the genome of the thirteen-lined ground squirrel efficiently blocks infection and replication of extant bornavirus. To our knowledge, this is the first report showing that endogenous nonretroviral RNA virus elements may function in antiviral defense, providing a potential role for RNA virus endogenization in host evolution.

List of Publications

Fujino K, Horie M, Honda T, Merriman DK and Tomonaga K. (2014) Inhibition of Borna disease virus replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** *111*:13175-13180.

Suzuki Y, Kobayashi Y, Horie M and Tomonaga K. (2014) Origin of endogenous bornavirus-like nucleoprotein elements in thirteen-lined ground squirrels. **Genes Genet. Syst.** 89:143-148.

Kojima S, Honda T, Matsumoto Y and Tomonaga K. (2014) Heat stress is a potent stimulus for enhancing rescue efficiency of recombinant Borna disease virus. **Microbiol. Immunol.** 58:636-42.

Keizo Tomonaga: Bornavirus infection: a unique life style of an animal RNA virus in the DNA habitat, DNA Habitat and its RNA Inhabitants. Salzburg Austria, 3-5 July, 2014.

Keizo Tomonaga: Bornavirus research: exploring new species and old members, State-of Art lecture “Bornavirus” , XVI International Congress of Virology, Montreal, Canada, 27 July - 1 August, 2014.

Masayuki H, Fujino K, Honda T and Tomonaga K.: Endogenous bornavirus-like elements: cellular co-option and impact on genome evolution, Mobile genetic elements and Genome evolution. Santa Fe, New Mexico, USA, 9-14 March 2014.

Honda T., Sofuku K. and Tomonaga K.: Epigenetic control of an endogenous bornavirus element expression in the human genome, Mobile genetic elements and Genome evolution, Santa Fe, New Mexico, USA. 9-14 March 2014.

Tomonaga K.: Endogenous bornavirus-like elements: cellular co-option and impact on genome evolution, Mobile genetic elements and Genome evolution. Santa Fe, New Mexico, USA, 9-14 March 2014.

Tomoyuki Honda, Daisuke Okuzaki, Akiko Makino, Shoko Nakamura, Keizo Tomonaga: Identification of the sensing mechanism of Borna virus ribonucleoprotein in the nucleus, International Union of microbiological Societies Congresses Montreal, CANADA, 27 July-1 August, 2014.

Akiko Makino, Kan Fujino, Takuji Daito, Tomoyuki Honda, Keizo Tomonaga: Expression of IGF2 affects Borna diseases virus production in infected cells, International Union of microbiological Societies Congresses Montreal, CANADA, 27 July-1 August, 2014.

Shoko Nakamura, Masayuki Horie, Mayo Yasugi, Tomo Dainoji, Atsushi Nakata, Keizo Tomonaga: The regulation and functional significance of GALNT3 expression during influenza A virus infection, International Union of microbiological Societies Congresses, Montreal, CANADA, 27 July-1 August, 2014.

Masayuki Horie, Yuki Kobayashi, Tomoyuki Honda, Takumi Akasaka, Nadine Gillich, Marcel a.Muller, Victor M.Corman, Yoshiyuki Suzuki, Keizo Tomonaga: Putative mammalian RNA-dependent RNA polymerase genes derived from an ancient Bornavirus, International Union of microbiological Societies Congresses, Montreal, CANADA, 27 July-1 August, 2014.

朝長啓造：ボルナウイルス研究 - 神経病原性から広がる基礎研究と応用、第 18 回日本神経ウイルス研究会、浜松、2014 年 6 月 20-21 日

朝長啓造：RNA ウイルス研究と小分子 RNA 第 6 回日本 RNAi 研究会（JARI 2014）、広島、2014 年 8 月 28-30 日

Keizo Tomonaga: Life in the nucleus: how and why bornavirus can coexist with the host. Wakate International Symposium, Discovery of Medical Sciences. Tsukuba, 6 November, 2014.

朝長啓造：ボルナウイルス研究から探るウイルスー宿主共進化、ウイルス研究所ー再生医科学研究所合同学術講演会、京都、2014 年 12 月 22 日

牧野晶子：ボルナウイルスの粒子産生制御機構の解析、3rd Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2014 年 1 月 13-15 日

本田知之：宿主細胞による核内ウイルス RNP 認識後応答の解明、3rd Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2014 年 1 月 13-15 日

中村祥子：A 型インフルエンザウイルス感染におけるムチン型糖転移酵素 GALNT3 の機能解析、3rd Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2014 年 1 月 13-15 日

朝長啓造：パンデミックから共存へーゲノム解析が明らかにするウイルスとの共進化ー第 28 回 国立大学共同利用・共同研究拠点協議会 知の拠点セミナー、東京、2014 年 1 月 17 日

Shoko Nakamura, Masayuki Horie, Mayo Yasugi, Tomo Daidoji, Atsushi Kuno, Daisuke Okuzaki, Akiko Makino, Tomoyuki Honda, Keizo Tomonaga: The 12th International Student Seminar, Kyoto, 17-20 February, 2014.

佐々悠木子、堀江真行、鈴木研太、加藤真樹、香川紘子、鈴木和彦、渋谷淳、Chanathip Thammakarn、竹原一明、古谷哲也、長井誠、大松勉、朝長啓造、岡ノ谷一夫、水谷哲也：日本のジュウシマツ由来の新しい遺伝子型のトリボルナウイルスの解析、第 7 回ボルナウイルス研究会、京都、2014 年 3

月 25 日

松永秀則、本田知之、朝長啓造：自閉症 49 検体における抗 BDV 抗体と抗 ABV 抗体の測定、第 7 回ボルナウイルス研究会、京都、2014 年 3 月 25 日

惣福梢、本田知之、朝長啓造：ボルナ病ウイルスが DNA ダメージ修復因子に与える影響、第 7 回ボルナウイルス研究会、京都、2014 年 3 月 25 日

小嶋将平、本田知之、朝長啓造：ボルナウイルスベクター作成効率の改良の試み、第 7 回ボルナウイルス研究会、京都、2014 年 3 月 25 日

松本祐介：分泌型ルシフェラーゼ発現ミニレプリコン系を用いたボルナ病ウイルスポリメラーゼの機能解析、第 7 回ボルナウイルス研究会、京都、2014 年 3 月 25 日

堀江真行、小林由紀、本田知之、赤々卓美、藤野寛、Nadine Gillich、Marcel A.Mueller、Victor M.Corman、鈴木善幸、Martin Schermmle、朝長啓造：コウモリゲノムに内在するボルナウイルス由来 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ様配列、第 7 回ボルナウイルス研究会、京都、2014 年 3 月 25 日

中村祥子、堀江真行、安木真世、大道寺智、久野敦、奥崎大介、牧野晶子、本田知之、成松久、中屋隆明、朝長啓造：A 型インフルエンザ感染におけるムチン型糖転移酵素 GALNT3 の機能解析、第 28 回インフルエンザ研究者交流会の会シンポジウム、鳥取、2014 年 7 月 4-6 日

牧野晶子、宮沢孝幸、鈴木善幸、三浦恭子、朝長啓造：ハダカデバネズミのゲノムに内在化したレトロウイルス様配列の解析、第 157 回日本獣医学会学術集会、札幌、2014 年 9 月 9-12 日

佐々悠木子、堀江真行、鈴木研太、加藤真樹、香川紘子、鈴木和彦、渋谷淳、Chanathip Thammakarn、竹原一明、古谷哲也、本田知之、朝長啓造、岡ノ谷一夫、水谷哲也：新規遺伝子型トリボルナウイルス（ABV-BF）の解析、第 157 回日本獣医学会学術集会、札幌、2014 年 9 月 9-12 日

Shohei Kojima, Tomoyuki Honda, Keizo Tomonaga, Nuclear localization of RNA derived from endogenous bornavirus-like nucleoprotein、第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014 年 9 月 23-26 日

Yuto Koike, Akiko Makino, Tomoyuki Honda, Keizo Tomonaga, Important domain of Borna disease virus P protein for its antagonistic activity against innate immunity response、第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014 年 9 月 23-26 日

牧野晶子、藤野寛、平井悠哉、惣福梢、本田知之、朝長啓造：ボルナ病ウイルス粒子産生に対する宿主因子 IGF2 の関与、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

惣福梢、本田知之、小嶋将平、朝長啓造：ヒト内在性ボルナウイルス様 N エLEMENT のエピジェネティック制御機構、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

小池悠斗、牧野晶子、本田知之、朝長啓造：ボルナ病ウイルス P タンパク質による自然免疫抑制作用に重要なアミノ酸領域の探索、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

中村祥子、堀江真行、大道寺智、本田知之、中屋隆明、小守壽文、朝長啓造：ムチン型糖転移酵素 Galnt3 ノックアウトマウスを用いた A 型インフルエンザウイルス感染動態の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

本田知之、小嶋将平、朝長啓造：内在性ボルナウイルス様ELEMENT の非コード RNA としての生理機能解明、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日

II. Second Group

Members

Associate Professor

Makoto Hijikata

Research Fellow

Sulyi Kim

Graduate Student

**Yoji Tsugawa, Yuichi Akahori, Hitomi Okamura,
Hikari Hasegawa**

Introduction

The researches carried out in this group are focused on hepatitis viruses, hepatitis B virus and hepatitis C virus, which cause chronic liver diseases, such as chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Our projects aim to reveal the lifecycles of these viruses, the interaction between human hepatocytes and these viruses at the molecular level. Development of novel anti-viral strategies based on our research outcomes is also intended. Understanding the pathogenesis of liver cancer and the liver differentiation using hepatic stem cells are also with a scope of our research purposes.

Topics

1) Monounsaturated long chain fatty acid plays a role in genome replication of hepatitis C virus.: H. HASEGAWA, H. OKAMURA, Y. AKAHORI, Y. NIO, M. HIJIKATA

Recently the direct anti-viral agents (DAA) against Hepatitis C virus (HCV) have been developed as highly effective anti-HCV drugs. Then chronic hepatitis C becomes to be now perceived as curable-disease accordingly. However, there, still, is a problem for treatment with DAA. Prolonged treatment with DAA sometimes cause the emergence of drug-resistant viruses. One of the way to address this problem seems to use the drug against cellular factors contributing HCV life cycle in the cells, because such drugs seldom produce drug resistant viruses. We, therefore, are trying to reveal the host factors required for HCV life cycle and to develop the strategy for inhibit the proliferation of HCV by suppressing the function of the factors.

Our chemical biological analysis showed that the specific inhibitor for acetyl-CoA carboxylase (ACC) 1 but not ACC2, in the malonyl CoA/long chain fatty acid pathway, suppressed HCV genome replication. We also confirmed the anti-HCV effect of the inhibitor for stearoyl-CoA desaturase (SCD), which has recently been reported to contribute to HCV replication. We observed that mono-unsaturated fatty acids, such as palmitoleic acid and oleic acid, that are products of SCD, inhibit the effect of ACC1 inhibitor, suggesting that the malonyl CoA/long chain fatty acid pathway mainly contribute to HCV genome replication by supplying the mono-unsaturated fatty acids.

Using HCV subgenomic replicon cells and HCVcc (JFH1) system, we evaluated the potential of a liver-targeted SCD inhibitor MK8245 as a candidate for novel HCV therapy. Co-treatment of MK8245 with HCV-DAA repressed HCV replication additively. The synergetic effect was also observed when treated with interferon alpha. These results demonstrate that MK8245 can be used for anti-HCV combination therapy by decreasing the frequency and the dosage of DAAs and interferon administration.

2) Study on a novel anti-HCV factor induced by type III Interferons: Y.TSUGAWA, N. HIRAGA, M. IMAMURA, T. WAKITA, K. CHAYAMA, M. HIJIKATA

Hepatitis C virus (HCV) is known to infect human liver and cause the hepatitis, but the interferon (IFN) response, a first-line defense against viral infection, of virus-infected hepatocytes has not been defined clearly yet. Previously, we have reported that IFN-alpha1 constitutively produced in human in human hepatocytes plays a role of priming antiviral response. We also observed rapid induction of type III IFN in the cells immediately after RNA viral infection. Recently the genome-wide association study suggested that SNPs around IFN-lambda3 gene, one of type III IFN gene, is closely related with the natural healing of HCV infection. However, the importance of type III IFN on the anti-HCV functions, compared to type I IFN, has remained unclear. We, therefore, have tried to identify the novel anti-HCV gene induced by type III IFN but not type I IFN. Firstly, the in silico analysis of microarray data concerning primary human hepatocytes

treated with IFN- α and IFN- λ 3 showed several groups of genes were specifically induced by IFN- λ 3. Data were confirmed by microarray analysis for the liver samples from IFN- λ treated chimeric mouse with humanized liver. We are now analyzing the functions of the gene of which expression was induced by IFN- λ 3 on the suppression of HCV life cycle.

List of Publications

Tsugawa Y., Kato H., Fujita T., Shimotohno K., Hijikata M. (2014) Critical role of interferon- α , constitutively produced in human hepatocytes in response to RNA virus infection, **PLoS ONE**, 9(2): e89869. doi:10.1371/journal.pone.0089869.

Akahori Y., Kato H., Fujita T., K. Watashi K., Wakita, Hijikata M.: Development of hepatitis B virus cell culture system using immortalized human hepatocytes producing exogenous Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide, 2014 International meeting on the molecular biology of hepatitis B viruses, Los Angeles, USA, 4-6 September, 2014

土方 誠: HCV 培養系開発から見出された新たな HCV 薬の標的、第 27 回広島肝臓研究会学術講演会、広島、2014 年 5 月 9 日

赤堀祐一、加藤博己、藤田尚志、渡士幸一、脇田隆字、土方 誠: ヒト NTCP 恒常発現不死化ヒト肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルス培養細胞感染系の構築、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

岡村 瞳、赤堀祐一、田中靖人、土方 誠: 不死化ヒト肝細胞を用いた HBV 培養細胞系の構築、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

長谷川輝、岡村 瞳、赤堀祐一、津川陽司、仁尾泰徳、土方 誠: 一価不飽和脂肪酸合成は HCV ゲノム複製に重要な役割を有する、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

阿部雄一、土方 誠、朝長 毅: リン酸化プロテオミクス解析による C 型肝炎ウイルス増殖に重要なウイルスタンパク質リン酸化修飾の網羅的探索、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

I. First Group

教授	朝長啓造
助教	本田知之
特定助教	牧野晶子
大学院生	惣福 梢、中村祥子、山本祐介、小嶋将平、小池悠斗、劉 笑舒、 柳井真瑚
事務補佐員	若城佳寿美

平成 26 年度は、4 月より生命科学研究科大学院生修士課程 1 年として小池悠斗、劉 笑舒、柳井真瑚が新たに加わった。また、平成 26 年 3 月より 10 月まで、日本学術振興会の外国人特別研究員（短期）として University of Pennsylvania の Nicholas F. Parrish が在籍した。

朝長は、7 月にザルツブルクでの国際シンポジウム、モンテリオールでの国際ウイルス学会でまた、国内では 6 月に日本神経ウイルス研究会、8 月に日本 RNAi 研究会、11 月に筑波大学国際シンポジウム等で招待講演を行った。7 月の国際ウイルス学会では、本田、牧野、中村も発表を行った。本田は横浜で開催された日本ウイルス学会において優れた若手研究者に贈られる日本ウイルス学会杉浦奨励賞を受賞した。その他、教室員の多くが、日本ウイルス学会年会（横浜）等の学会で発表した。

本年度の研究活動では、主に（1）ボルナ病ウイルス（BDV）、ならびに（2）インフルエンザウイルスに関する研究を行った。（1）では、BDV の細胞核における持続感染機構を明らかにするために、感染細胞の核内に形成される BDV の複製場（vSPOT）の詳細な構造を超解像度顕微鏡を用いて解析した。この成果は、共同研究者である平井が日本ウイルス学会で発表を行った。また、vSPOT と宿主の核内スッペクルとの関連性については、本田が新学術領域「非コード RNA」の研究テーマとして推進した。さらに、細胞核における BDV RNP の宿主認識機構については、朝長が「挑戦的萌芽研究」においてウイルス RNP の構造的基盤を解析するとともに、本田が新学術領域「感染マトリックス」において RNP 認識に関与する宿主因子の探索を行った。一方で、内在性ボルナウイルス（EBLs）研究に関しては、朝長が「基盤研究 A」においてヌクレオプロテインに由来する EBL（EBLN）の発現と機能解析を進めた。特に、ジリスゲノムからクローニングされた EBLN が、外来性 BDV の感染を培養細胞において完全にブロックすることを明らかにし報告した。これらの研究に加えて、朝長は BDV ベクターの開発研究を「革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事

業」において進めた。本年度は牧野らが組換え BDV の粒子産生効率に関与する宿主因子を同定するとともに、iPS 細胞への BDV ベクターの適用方法の開発を行なった。(2) では、中村が日本学術振興会特別研究員として O 型糖鎖修飾である GALNT3 と A 型インフルエンザウイルスに関する研究を進めた。特に、*ganlt3* のノックアウトマウスを用いることで、A 型インフルエンザウイルスの核内複製に関わる GALNT3 の役割について詳細な解析を行った。

II. Second Group

准教授	土方 誠
博士研究員	金 ソルイ
大学院生	津川 陽司、赤堀 祐一、岡村 瞳、長谷川 輝

本年度は、4 月より金ソルイがポスドクとして、新たに加わった。また 4 月から 6 月まで平岩正枝が実験補助員として参加した。

当研究分野土方グループでは、C 型肝炎ウイルスならびに B 型肝炎ウイルスとその感染標的であるヒト肝細胞の研究を中心におこなっている。肝炎ウイルスの研究ではその生活環やウイルスと肝細胞間の相互作用を分子レベルで解明することと、その結果をもとに抗ウイルス薬剤開発を目指した研究をおこなっている。また、ヒト肝細胞に関してはヒト肝幹細胞を用いた肝分化と肝炎ウイルス感染の研究から肝臓などの慢性肝疾患の発症機構を明らかにするための研究をおこなっている。

1) C 型肝炎ウイルス感染増殖に関わる宿主細胞の同定とその機能解析

C 型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus, HCV) の感染者は、現在、全世界で 1 億 7000 万人、日本では約 200 万人に及ぶと推定されている。HCV の持続感染によって、慢性肝炎が引き起こされ、さらに肝硬変や肝細胞がんの発症へ進展することが知られている。我々は、HCV のヒト肝細胞における感染増殖に関与する宿主因子の同定とその機能解析をおこなっている。本年度は、特に、HCV ゲノム複製との関連が報告されているが、まだ、その関連の詳細が明らかになっていない脂肪酸生合成系に着目し、新たな抗 HCV 薬候補の検討を行った。まず、HCV サブゲノムレプリコン細胞、および、感染性組換え体 HCV 産生系を用いて、各種脂肪酸生合成の酵素に対する阻害薬剤の HCV ゲノム複製に対する抑制効果を解析した。その結果、新たにマロニル CoA 経路により産生された長鎖飽和脂肪酸であるステアリン酸やパルミチン酸を不飽和化し、一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸やパルミトレイン酸を産生するステアロイル CoA 不飽和化酵素 (Stearoyl-CoA desaturase, SCD) の阻害薬が HCV ゲノム複製を抑制することを明らかにした。また、この抑制効果は、オレイン酸

等、一価不飽和脂肪酸を培地に添加することで解除されたことから、一価不飽和脂肪酸が HCV ゲノム複製に重要であることがわかった。さらに、この薬剤は既存の DAA との併用で相加的、インターフェロン α とは相乗的な HCV ゲノム複製抑制作用を示すことを見出した。以上の結果から、脂肪酸生合成において、SCD を介した一価不飽和脂肪酸合成が HCV ゲノム複製に重要な役割を果たしており、SCD 阻害剤が DAA との併用に用いる新規の抗 HCV 治療薬候補となることがわかった。

2) III 型インターフェロン (IFN) により誘導される新たな HCV 感染抑制因子の解析

HCV による慢性肝疾患はこの RNA ウイルスの持続感染が大きな原因となっている。これまでに HCV の持続感染には自然免疫、特に IFN lambda が関連することがわかっている。したがって、IFN lambda 特異的な抗 HCV 機構を明らかにすることが、HCV の持続感染機構の解明に重要であると考えられる。そこで、本年度は、IFN alpha では誘導されず、IFN lambda によって誘導される遺伝子群の解析を行い、IFN lambda 特異的な抗 HCV 効果を示す遺伝子の同定を目指した。インターネット上に存在するマイクロアレイのデータを解析することにより、初代培養肝細胞を IFN alpha と IFN lambda で処理した時のそれぞれの細胞内で誘導される遺伝子発現を比較し、IFN lambda 処理によってのみ、顕著に発現が変化する遺伝子群を明らかにした。また、この結果を確認するためにヒト肝細胞キメラマウスを IFN lambda で処理し、その肝臓から RNA を抽出して、未処理マウスとの間で遺伝子発様式を比較した。その結果、IFN lambda によってその発現が変化する遺伝子群がいくつか見出された。現在、これらの遺伝子産物と HCV 感染増殖との関連に関して解析を行っている。

3) B 型肝炎ウイルスの関する研究

これまで B 型肝炎ウイルス (HBV) に対して感染許容性を示す細胞として初代ヒト肝細胞、HepaRG 細胞等が報告されてきた。しかし、これらの細胞は HBV 感染の再現性が低い等の問題点があった。最近、ヒト肝癌由来の HepG2 細胞に、HBV 感染受容体として報告されたヒト Na⁺ / taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) を発現させた実験系が開発された。しかしながら、HBV 感染により引き起こされる正常ヒト肝細胞の変化を解析するための実験系は存在しない。そこで肝細胞に近い性質を保持した不死化ヒト肝細胞 (HuS-E/2 細胞) を用いて、HBV と肝細胞の相互作用を解析することが可能な HBV 感染効率の良い培養細胞系の開発をおこなっている。HuS-E/2 細胞にヒト NTCP の C 末端側に TurboGFP (tGFP) タグを付加した発現プラスミドを HuS-E/2 細胞に導入し、薬剤選択により NTCP-tGFP 恒常発現細胞株 HuS-E/2-NTCP-tGFP 細胞を樹立した。得られたクローン細胞株に HBV を感染させ、その感染を評価し、効率の良い感染増殖のために必要な細胞環境について解析を進めている。また、HBV ゲノムを含むプラスミドを HuS-E/2 細胞に導入し、HBV ゲノム複製を再現する培養細胞系についても構築を進めている。HuS-E/2 細胞は立体培養

する事でより本来のヒト肝細胞に近い性質を示すようになるが、HBV ゲノムを導入したこの細胞も立体培養することで HBV 粒子を細胞外に放出することを示唆する結果を得ている。また、HBV が細胞内で複製している既存の培養細胞系を用いてケミカルバイオロジーの手法より、HBV の生活環に関わる細胞因子を数種類同定しており、それら細胞因子を標的とした新たな抗 HBV 薬の開発のための基礎研究を進めている。

Laboratory of Molecular Genetics

Members

Professor	Takashi Fujita
Associate Professor	Hiroki Kato
Assistant Professor	Amane Kogure
Assistant Research Staff	Ryo Narita
Assistant Technical Staff	Seigyoku Go
Graduate Student	Wan-Ling Yao, Shintaro Yamada, Dacqin Kasumba, Qin Mian, Hideo Onisawa, Saki Okumura, Ryo Yamaue, Mai Wakimoto, Takara Hajyake, Sotaro Ikeda, Tim-Wai Sha, Amanda Horton, Hsu Chung Chen, Yukie Ootakaki, Shota Shimuzu, Saki Sugiyama, Fumitaka Miyoshi, Reo Yoshimura, Ivana Duic
Visiting Researcher	Masahide Funabiki
Technical Assistant	Emi Hirano
	Etsu Murakami
Secretary	Satomi Koshiba

Introduction

We have been studying on antiviral innate immunity, particularly on the mechanism of type I interferon (IFN) gene regulation. 10 years ago, we identified viral RNA sensors, collectively termed as RIG-I-Like receptor. We have been focusing on the mechanism how RLR recognizes non-self RNA from self RNA. We also try to understand how viral replication within the cells is sensed and triggers signals to activate antiviral program, by live cell imaging. We study different viruses including Polio, Influenza A, SFTS, hepatitis B viruses in the context of antiviral immune responses of the host.

Topics

Autoimmune Disorders Associated with Gain of Function of the Intracellular Sensor MDA5: FUNABIKI, M., KATO, H., MIYACHI, M., TOKI, H., MOTEGI, H., INOUE, M., MINOWA, O., YOSHIDA, A., DEGUCHI, K., SATO, H., ITO, S., SHIROISHI, T., TAKEYASU, K., NODA, T. and FUJITA, T.

MDA5 is an essential intracellular sensor for several viruses, including picornaviruses, and elicits antiviral interferon (IFN) responses by recognizing viral dsRNAs. MDA5 has been implicated in autoimmunity. However, the mechanisms of how MDA5 contributes to autoimmunity remain unclear. Here we provide direct evidence that dysregulation of MDA5 caused autoimmune disorders. We established a mutant mouse line bearing MDA5 mutation by ENU mutagenesis, which spontaneously developed lupus-like autoimmune symptoms without viral infection. Inflammation was dependent on an adaptor molecule, MAVS indicating the importance of MDA5 signaling. In addition, intercrossing the mutant mice with type I IFN receptor-deficient mice ameliorated clinical manifestations. This MDA5 mutant could activate signaling in the absence of its ligand but was paradoxically defective for ligand- and virus-induced signaling, suggesting that the mutation induces a conformational change in MDA5. These findings provide insight into the association between disorders of the innate immune system and autoimmunity.

DHX36 Enhances RIG-I Signaling by Facilitating PKR-Mediated Antiviral Stress Granule Formation: YOO, J-S., TAKAHASHI, K., NG, CS., OUDA, R., ONOMOTO, K., YONEYAMA, M., LAI, J-C., LATTMANN, S., NAGAMINE, Y., MATSUI, T., IWABUCHI, K., KATO, H. and FUJITA, T.

RIG-I is a DExD/H-box RNA helicase and functions as a critical cytoplasmic sensor for RNA viruses to initiate antiviral interferon (IFN) responses. Here we demonstrate that another DExD/H-box RNA helicase DHX36 is a key molecule for RIG-I signaling by regulating double-stranded RNA (dsRNA)-dependent protein kinase (PKR) activation, which has been shown to be essential for the formation of antiviral stress granule (avSG). We found that DHX36 and PKR form a complex in a dsRNA-dependent manner. By forming this complex, DHX36 facilitates dsRNA binding and phosphorylation of PKR through its ATPase/helicase activity. Using DHX36 KO-inducible MEF cells, we demonstrated that DHX36 deficient cells showed defect in IFN production and higher susceptibility in RNA virus infection, indicating the physiological importance of this complex in host defense. In summary, we identify a novel function of DHX36 as a critical regulator of PKR-dependent avSG to facilitate viral RNA recognition by RIG-I-like receptor (RLR).

A novel function of human Pumilio proteins in cytoplasmic sensing of viral infection: NARITA, R., TAKAHASI, K., MURAKAMI, E., HIRANO, E., YAMAMOTO, SP., YONEYAMA, M., KATO, H. and FUJITA, T.

RIG-I-like receptor (RLR) plays a pivotal role in the detection of invading pathogens to initiate type I interferon (IFN) gene transcription. Since aberrant IFN production is harmful, RLR signaling is strictly regulated. However, the regulatory mechanisms are not fully understood. By expression cloning, we identified Pumilio proteins, PUM1 and PUM2, as candidate positive regulators of RIG-I signaling. Overexpression of Pumilio proteins and their knockdown augmented and diminished IFN- β promoter activity induced by Newcastle disease virus (NDV), respectively. Both proteins showed a specific association with LGP2, but not with RIG-I or MDA5. Furthermore, all of these components were recruited to NDV-induced antiviral stress granules. Interestingly, biochemical analyses revealed that Pumilio increased double-stranded (ds) RNA binding affinity of LGP2; however, Pumilio was absent in the dsRNA-LGP2 complex, suggesting that Pumilio facilitates viral RNA recognition by LGP2 through its chaperon-like function. Collectively, our results demonstrate an unknown function of Pumilio in viral recognition by LGP2.

List of Publications

Funabiki M, Kato H, Miyachi M, Toki H, Motegi H, Inoue M, Minowa O, Yoshida A, Deguchi K, Sato H, Ito S, Shiroishi T, Takeyasu K, Noda T and Fujita T (2014) Autoimmune Disorders Associated with Gain of Function of the Intracellular Sensor MDA5. **Immunity** 40, 199-212

Yoo, J-S., Takahasi, K., Ng, CS., Ouda, R., Onomoto, K., Yoneyama, M., Lai, J-C., Lattmann, S., Nagamine, Y., Matsui, T., Iwabuchi, K., Kato, H. Fujita, T. (2014) DHX36 Enhances RIG-I Signaling by Facilitating PKR-Mediated Antiviral Stress Granule Formation. **PLoS Pathog** 10(3): e1004012. doi:10.1371/journal.ppat.1004012

Oda, H., Nakagawa, K., Abe, J., Awaya, T., Funabiki, M., Hijikata, A., Nishikomori, R., Funatsuka, M., Ohshima, Y., Sugawara, Y., Yasumi, T., Kato, H., Shirai, T., Ohara, O., Fujita, T., Heike, T. (2014) Aicardi-Goutières syndrome is caused by IFIH1 mutations. *Am J Hum Genet.*; 95(1):121-5.

Narita R, Takahasi K, Murakami E, Hirano E, Yamamoto SP, Yoneyama M, Kato H, Fujita T (2014) A novel function of human Pumilio proteins in cytoplasmic sensing of viral infection. **PLoS Pathog.**; 10(10): e1004417. doi: 10.1371/journal.ppat.1004417.

Yoo JS, Kato H, Fujita T (2014) Sensing viral invasion by RIG-I like receptors. **Curr. Opin. Microbiol.** 2014

20, 131-8

Onomoto K, Yoneyama M, Fung G, Kato H, Fujita T. (2014) Antiviral innate immunity and stress granule responses. **Trends Immunol.** 35, 420-8

Kato H, Fujita T. (2014) Autoimmunity caused by constitutive activation of cytoplasmic viral RNA sensors. **Cytokine Growth Factor Rev.** 25, 739-743

Fujita T.: Regulation of antiviral innate immunity by RIG-I-like receptors. The NF- κ B system in health and disease, Keystone Symposia, Keystone, USA, 23-28 February, 2014.

Fujita T.: Blocking innate immune responses enhanced HBV replication. 2014 TASL-Japan Hepatitis B Workshop, Taipei, Taiwan, 18-20 April, 2014.

Narita, R., Takahashi, K., Yoneyama, M. and Fujita, T.: A Novel Function of Human Puumala Proteins in Cytoplasmic Sensing of Viral Infection, The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Nara, 23-26 September, 2014.

Fujita, T.: Regulation of antiviral innate immunity by RIG-I-Like Receptors, EMBO Workshop Human RNA Viruses, Istanbul, Turkey, 6-8 October, 2014.

Fujita, T.: Dysregulation of MDA5-dependent signaling causes autoimmune disorder, NHRI/IBMS Joint International Conference on Inflammation & Disease, Taipei, Taiwan, 17 October, 2014.

Fujita, T.: Dysregulation of MDA5-dependent signaling causes autoimmune disorder, 2014 International Conference on Infectious Disease and Cancer, Kaohsiung, Taiwan, 18 October, 2014.

T. Fujita: Antiviral innate immunity in health and disease, NIH-Japan-JSPS Symposium-Highlights from the frontier of biomedical science from NIH and Japan, Bethesda, USA, 23-24 October, 2014.

Yao, W-L., Kaname, Y., Ikeda, S., Kato, H. and Fujita, T.: Innate Immune Responses Against Hepatitis B Virus in ES2, 2014 International Meeting on Molecular Mechanism of Hepatitis B Viruses, UCLA, USA, 3-6 September, 2014.

池田宗太郎、Yao Wan-Ling、Qin Mian、大高木結媛、要祐喜、加藤博己、藤田尚志：B型肝炎ウイ

ルス（HBV）感染に対する I 型インターフェロンの影響、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

山田辰太郎、下島昌幸、成田亮、大石真也、高橋清大、加藤博己、西條政幸、藤田尚志：ダニ媒介性ウイルスの非構造蛋白質による自然免疫抑制機構、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

Yao, W-L., Ikeda, S., Ootakaki, Y., Qin, M., Kaname, Y., Kato, H. and Fujita, T.: Innate Immune Responses Against Hepatitis B Virus in ES2、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

Wan-Ling Yao, Yuuki Kaname, Sotaro Ikeda, Hiroki Kato, Takashi Fujita: Innate immune responses against Hepatitis B Virus in ES2, The 11th JSH Single Topic Conference, Hiroshima, 21-22 November, 2014.

教授	藤田尚志
准教授	加藤博己
特定助教	木檜 周
教務補佐員	成田亮
技術補佐員	呉成旭
大学院生	Yao Wan-Ling (姚琬玲)、山田辰太郎、Dacquin Kasumba、 Qin Mian (覃勉)、鬼澤秀夫、奥村咲、山上亮、脇本舞、羽者家宝、 池田宗太郎、Sha Tim-Wai (沙添威)、Horton Amanda、 Hsu Chung Chen (許伸辰)、大高木結媛、清水翔太、杉山沙希、三好史高、 吉村礼桜、Ivana Duic
共同研究者	船曳正英
技術職員	平野恵未 村上絵津
秘書	小柴里美

当研究分野ではウイルス感染に応答して引き起こされる I 型インターフェロンの発現誘導などの、自然免疫反応のメカニズムを研究している。この一連の反応は細胞がウイルスの感染を感知することから開始される。この反応をつかさどるセンサー分子が retinoic acid-inducible gene-I, (RIG-I) であることを発見した。RIG-I に類似した MDA5、LGP2 という分子も存在しており、これらを総称して RIG-I like receptor (RLR) と呼ぶ。

本年度の研究成果のうち原著論文 1 編について解説する。

Funabiki M, Kato H, Miyachi M, Toki H, Motegi H, Inoue M, Minowa O, Yoshida A, Deguchi K, Sato H, Ito S, Shiroishi T, Takeyasu K, Noda T and Fujita T (2014) : Autoimmune Disorders Associated with Gain of Function of the Intracellular Sensor MDA5. **Immunity** 40, 199-212

細胞内ウイルスセンサー MDA5 は、ピコルナウイルス科を含むウイルス感染時において、ウイルス由来二本鎖 RNA (double-stranded RNA; dsRNA) を認識し抗ウイルス自然免疫応答を誘導する。一方、同分子は自己免疫疾患への関与が近年示唆されてきた。しかし、MDA5 がどのように自己免

疫疾患に関与しているのか、その機構は未だ明らかにはなっていない。本研究では、MDA5 点突然変異が過剰な免疫応答を誘導し、自己免疫疾患を誘発する機構をマウスモデルにおいて明らかにした。

同マウスは ENU ミュータジェネシスによって樹立されたもので、ループス腎炎様の糸球体腎炎を発症するマウス系統が樹立され、MDA5 に単一のアミノ酸変異 (G821S) を持つことが判明した。糸球体腎炎はアダプター分子である MAVS に依存し、MDA5-MAVS シグナル伝達経路が同マウスの病態に必須であることが明らかとなった。一方、I 型 IFN 受容体を欠損させた MDA5 変異マウスでは、糸球体腎炎の程度は軽快するものの依然として腎炎が惹起されたことから、I 型 IFN と共に NF- κ B 依存的炎症性サイトカインも病態へ関与していることが推測された。また、G821S 変異体は MDA5 のリガンドである dsRNA に対する応答性を喪失している一方、リガンド非存在下においては I 型 IFN プロモーター活性を強く誘導し、同変異が恒常活性型変異であることが明らかとなった。

本研究では MDA5 点突然変異が自己免疫疾患を誘発する機構について、マウスモデルを用いて明らかにした。これらの結果は、MDA5 依存的な自己免疫疾患に対する予防や新たな治療法への可能性を示唆すると同時に、異常な自然免疫応答が自己免疫疾患を誘発する可能性を示した。

研究プロジェクト

- 1) RIG-I の細胞内局在と活性化の解析 (呉、脇本、清水、加藤)
- 2) マウス個体での RLR の機能の解析 (羽者家、平野、加藤)
- 3) RLR と自己免疫疾患の解析 (鬼澤、奥村、杉山、奥村、加藤、船曳)
- 4) 木酢液の抗ウイルス活性 (成田、加藤)
- 5) 植物由来の二重鎖 RNA による抗ウイルス応答の研究 (羽者家、三好、Dacquin、加藤)
- 6) 抗ウイルス応答における新規因子の研究 (Yoo、Sha、成田、Amanda、Hsu、加藤)
- 7) 抗ウイルス応答の生細胞での可視化 (Ng、成田、Yoo、呉、脇本)
- 8) 原子間力顕微鏡を用いた RLR と RNA の結合の解析 (山上、Duic、吉村、加藤)
- 9) ウイルスヌクレオキャプシドと抗ウイルス応答の解析 (呉、Sha、Lippert、加藤)
- 10) B 型肝炎の新規治療薬を開発するための研究 (要、Yao、池田、大高木、Qin、平野、加藤)
- 11) SFTSV による自然免疫阻害機構の研究 (山田、加藤)

共同研究 (敬称略)

小池 智 ((財) 東京都医学総合研究所・ウイルス感染プロジェクト) 「ピコルナウイルス感染に応答した自然免疫誘導機構の解析」

竹安邦夫 (生命科学研究科) 「原子間力顕微鏡を用いた RLR と RNA の結合の解析」

藤原敬宏 (iCeMS) 「抗ウイルス応答の可視化」

三森経世（医学研究科）「RLR と自己免疫疾患の解析」

井上麻紀（理研バイオリソースセンター）腎炎発症マウスの解析

渡辺隆司（生存研）「木酢液の抗ウイルス活性」

Laboratory of Biochemistry

Members

Professor	Mutsuhito Ohno
Assistant Professor	Makoto Kitabatake
	Ichiro Taniguchi
Research Fellow	Tomoko Sakata
	Toshihiko Takeiwa
Graduate Student	Takahito Kawamoto, Kan Suzuki

Introduction

In eukaryotic cells, many genes are separated by introns into multiple exons that should be joined together. In addition, the cell itself is separated by the nuclear envelope into two major compartments, the nucleus and the cytoplasm. These two types of separations necessitate specific gene expression mechanisms such as RNA splicing and nuclear transport. Prof. Mutsuhito OHNO's laboratory is studying various aspects of eukaryotic gene expression with great emphasis on "RNA" as a key molecule. In addition, we are also working on quality control mechanisms of eukaryotic ribosome particles.

Topics

1) RNA distribution in the cell:

1-1) p54nrb/ NonO and PSF promote U snRNA nuclear export by accelerating its export complex assembly

The assembly of spliceosomal U snRNPs in metazoans requires nuclear export of U snRNA precursors. Four factors, nuclear cap-binding complex (CBC), phosphorylated adaptor for RNA export (PHAX), the export receptor CRM1, and RanGTP, gather at the m⁷G-cap-proximal region and form the U snRNA export complex. Here we show that the multi-functional RNA-binding proteins p54nrb/NonO and PSF are U snRNA export stimulatory factors. These proteins, likely as a heterodimer, accelerate the recruitment of PHAX, and subsequently CRM1 and Ran onto the RNA substrates *in vitro*, which mediates efficient U snRNA export *in vivo*. Our results reveal a new layer of regulation for U snRNA export and, hence, spliceosomal U snRNP biogenesis.

1-2) HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment

Nuclear RNA export pathways in eukaryotes are often linked to the fate of a given RNA. Therefore, the choice of export pathway should be well-controlled to avoid an unfavorable effect on gene expression. Although some RNAs could be exported by more than one pathway, little is known about how the choice is regulated. This issue is highlighted when the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein induces the export of singly spliced and unspliced HIV-1 transcripts. How these RNAs are exported is not well understood because such transcripts should have the possibility of utilizing CRM1-dependent export via Rev or cellular TAP/NXF1-dependent export via the transcription/export (TREX) complex, or both. Here we found that Rev suppressed TAP/NXF1-dependent export of model RNA substrates that recapitulated viral transcripts. In this effect, Rev interacted with the cap-binding complex and inhibited the recruitment of the TREX complex. Thus Rev controls the identity of the factor occupying the cap-proximal region that determines the RNA export pathway. This ribonucleoprotein remodeling activity of Rev may favor viral gene expression.

1-3) Exportin-5 mediates nuclear export of SRP RNA in vertebrates

The Signal Recognition Particle is a ribonucleoprotein complex that is essential for the translocation of nascent proteins into the endoplasmic reticulum. It has been shown that the RNA component (SRP RNA) is exported from the nucleus by CRM1 in the budding yeast. However, how SRP RNA is exported in higher species has been elusive. Here we show that SRP RNA does not use the CRM1 pathway in *Xenopus* oocytes. Instead, SRP RNA utilizes the same export pathway as pre-miRNA and tRNA as demonstrated by cross-competition experiments. Consistently, the recombinant Exportin-5 protein specifically stimulated export of SRP RNA as well as of pre-miRNA and tRNA, whereas an antibody raised against Exportin-5 specifically inhibited export of the same RNA species. Moreover, biotinylated SRP RNA can pull down Exportin-5 but not CRM1 from HeLa cell nuclear extracts in a RanGTP-dependent manner. These results, taken together, strongly suggest that the principal export receptor for SRP RNA in vertebrates is Exportin-5 unlike in the budding yeast.

1-4) Analysis of RNA sorting system for nuclear export in *Drosophila*

Different RNA species are exported from the nucleus by distinct export factors. Although this specificity indicates that each RNA species is distinguished in the nucleus, the mechanism is not well understood. We have recently revealed that, in vertebrates, mRNA and spliceosomal U snRNA are sorted according to their lengths, in which hnRNP C tetramer measures RNA length as a molecular ruler. However, *Drosophila melanogaster* has no apparent hnRNP C homologs. To understand mRNA/U snRNA classification in *Drosophila*, we performed an *in vitro* RNA-protein binding assay with purified *Drosophila* proteins and S2 whole cell lysate. We have obtained the result suggesting that, also in *Drosophila*, mRNA and U snRNA are sorted by their lengths.

2) rRNA quality control mechanisms:

How the eukaryotic cells deal with non-functional RNA molecules that were either mutated or damaged? We are searching for novel RNA quality control mechanisms in mammalian and yeast cells by mainly focusing on ribosomal RNAs.

Quality control mechanisms operate in various steps of ribosomal biogenesis to ensure the production of functional ribosome particles. It was previously reported that mature ribosome particles containing nonfunctional mutant rRNAs are also recognized and selectively removed by a cellular quality control system (nonfunctional rRNA decay; NRD).

2-1) Crt10 directs the cullin-E3 ligase Rtt101 to nonfunctional 25S rRNA decay

Nonfunctional mutant ribosomal RNAs in 40S or 60S subunits are selectively degraded in eukaryotic cells. We previously reported that NRD of 25S rRNA required cullin-E3 ligase Rtt101 and its associating factor Mms1, both of which are involved in DNA repair. Although Mms22, an accessory component of the E3 complex, was suggested to direct the E3 complex to DNA repair, the factor that directs the complex to 25S NRD remained unknown. Here we show that another accessory component, Crt10 is required for 25S NRD, but not for DNA repair, suggesting that this accessory component specifies the function of the E3 complex differently. We also show that the Crt10-containing E3 complexes can be further divided into sub-complexes, one of which contains Paf1 complex, a Pol-II binding complex modulating the transcription of stress-related genes. Our results show the convergence of multiple pathways for stresses that harm nucleic acids and provide a molecular framework for the substrate diversity of the complex.

List of Publications

Izumi, H., McCloskey, A., Shinmyozu, K. and Ohno, M. (2014) p54^{nrb}/NonO and PSF promote U snRNA nuclear export by accelerating its export complex assembly. **Nucleic Acids Research** 42(6), 3998-4007.

Yoshimoto R., Okawa, K., Yoshida, M., Ohno, M. and Kataoka, N. (2014) Identification of a novel component C2ORF3 in the lariat-intron complex: Lack of C2ORF3 interferes with pre-mRNA splicing via intron turnover pathway. **Genes Cells** Jan 19(1), 78-8.

Taniguchi, I., McCloskey, A. and Ohno, M. (2014) Analysis of RNA localization and export in *Xenopus* oocytes and mammalian cells. **Methods Cell Biol** 122, 395-413

Taniguchi, I., Mabuchi, N. and Ohno, M : HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment. 16th RNA meeting. Nagoya, 23-25 July, 2014.

Takeiwa, T, and Ohno, M : Role of exportin-5 in nuclear export of SRP RNA. 16th RNA meeting. Nagoya, 23-25 July, 2014.

Suzuki, K., Taniguchi, I. and Ohno, M : Analysis of RNA sorting system for nuclear export in Drosophila. 16th RNA meetin. Nagoya, 23-25 July, 2014.

北畠真、坂田知子、大野睦人:真核生物リボソームの品質管理. 「RNA と生体機能」第3回懇談会、伊東市、2014年10月25-26日

教授	大野睦人
助教	北畠真
助教	谷口一郎
特定研究員	坂田知子
	竹岩俊彦
大学院生	川本崇仁、鈴木完

細胞の中の RNA の大部分は裸ではなくタンパク質との複合体 (RNP) として存在し機能する。当研究室は、RNP の形成・構造変換・輸送・解体・品質管理など、RNP をめぐる様々な現象に興味を持っている。

2014 年 4 月に、1 名が海外留学、2 名が就職で転出し、博士後期課程と修士課程にそれぞれ 1 名ずつ入学した。その結果、大野研究室には、教授、秘書、2 名の助教、2 名の特定研究員、1 名の博士後期課程大学院生、1 名の修士課程大学院生が在籍することとなった。

I. RNP の核細胞質間の輸送

核外輸送される主要な RNA には、翻訳に関わるリボソーム RNA (rRNA) や転移 RNA (tRNA)、スプライシングに関わるウリジンリッチ 核内低分子 RNA (U snRNA)、メッセンジャー RNA (mRNA)、マイクロ RNA (miRNA) などがあるが、これらの RNA は、それぞれの RNA 種に固有の輸送因子群が核内で結合した後、細胞質へと輸送される。核内でそれぞれの RNA に結合する因子群は、核外輸送を司るだけでなく、核外輸送後のそれぞれの RNA の運命 (局在化、翻訳、安定性など) をも規定することが明らかになってきた。つまり、RNA の種類は核内で既に核外輸送因子群によって識別されていて、その識別がこれら様々な RNA の運命全体に影響を与えるのである。

他方、snoRNA や scaRNA など、おそらく核外輸送されずに核内の様々なドメインに輸送される RNA も存在する。さらに、一種の RNA 品質管理機構として、イントロンを含む mRNA 前駆体などの未成熟 RNA は成熟化するまで核の中に留められる。また、ウイルスの中には、RNA 輸送を制御することによって増殖するものが多数ある。

以上のような RNA の選択的分配制御は遺伝子発現に非常に重要であるが不明な点が多い。この

ような RNA の選別は RNA 上のどのような目印を識別して行われるのか、またその識別を行うタンパク質因子群はどのようなものなのか？本研究は、関連したいくつかの点に焦点を絞り、細胞内の RNP 分配における制御機構を明らかにすることを目的とする。

1. U snRNA 核外輸送に関与する新規因子

U snRNA は主要なスプライシング因子である U snRNP の RNA 成分である。U snRNA は RNA ポリメラーゼ II 型で転写されるため、その 5' 末端には m7G 型のキャップ構造が形成され、そこにはキャップ構造結合タンパク質複合体 (cap-binding complex, CBC) が結合する。次に、PHAX (phosphorylated adaptor for RNA export) というアダプタータンパク質がキャップに結合した CBC とキャップ近傍の RNA に結合することにより RNA 上に呼び込まれ、その PHAX が今度は NES (nuclear export signal, 核外輸送シグナル) の輸送因子 CRM1/RanGTP を呼び込み、U snRNA 核外輸送複合体が完成し、この複合体が核膜孔を通過する。このように、U snRNA の核外輸送のシナリオの基本はすでに解明されているが、様々なシグナルに対応して、U snRNA の核外輸送を促進したり阻害したりするような生物学的制御を司るような U snRNA 核外輸送の制御因子はこれまでに同定されていない。

当研究室では「RNA の長さ」を測る因子の探索過程で偶然、U snRNA 輸送因子 PHAX が RNA に結合することを促進する活性を HeLa 細胞核抽出液中に発見していた。我々はこの活性を追跡し、p54nrb と PSF という 2 つの RNA 結合性タンパク質のヘテロ 2 量体にたどり着いた。様々な in vitro と in vivo の実験の結果、我々はこの因子が U snRNA 核外輸送複合体の形成を促進することによって、U snRNA 核外輸送を促進するアクセサリ因子であることを示した。この結果を論文発表した。

2. HIV-1 Rev タンパク質による RNA 核外輸送複合体のリモデリング

上述のように、通常はイントロンを含む mRNA 前駆体は細胞質へ輸送されず、スプライシングにより成熟 mRNA に変換されるまで核内に留まる。エイズウイルス HIV-1 は、自身のゲノムにコードされる Rev 蛋白質を用いて、スプライシングを全くあるいは部分的にしか受けていないウイルス RNA を細胞質に輸送させる。これは、核外輸送シグナル (NES) を持つ Rev がウイルス RNA 上の RRE と呼ばれる RNA 配列に結合することによって、RNA 核外輸送経路を通常の mRNA のそれから、NES 受容体 CRM1 依存性のそれへとスイッチする事によって成し遂げられる。この RNA 核外輸送経路のスイッチングにおいて、ウイルス特異的因子 Rev と宿主側の mRNA 輸送因子群の間の相克がいかにして解消されるのかについては全く明らかではない。アフリカツメガエルのお母細胞核への微量注入法を用い、イントロンを含むウイルス RNA を模擬したモデル RNA の核外輸送経路が、Rev によって宿主型からウイルス型へスイッチすることを確認した。さらに、Rev が輸送経路

をウイルス型にするだけでなく、宿主側の輸送経路を阻害していることがわかった。また、実際の HIV-1 感染細胞に近い系でもこれと合致する結果が見られることを確認した。さらに、この阻害効果の分子機構として、Rev が CBC と相互作用することにより、アダプターである Aly/REF のリクルート面とを阻害するという分子機構を明らかにした。これらの結果を論文発表した。

3. 脊椎動物における SRP RNA の核外輸送の研究

真核細胞では、核内において様々な RNA が転写されており、その多くが転写後に核膜孔を通過して細胞質へと輸送される。過去の研究から、RNA が細胞質へと輸送されるためには核外輸送とよばれるタンパク質と複合体を形成する必要があることが示されている。さらに、RNA はそれぞれに特異的な核外輸送によって細胞質へと輸送されることが明らかにされている。

現在までに多くの RNA の核外輸送について研究が行われ、その分子機構が解明されつつある一方で、本研究の研究対象である SRP RNA の核外輸送については、特に脊椎動物において、研究が立ち遅れていた。SRP RNA は、真核細胞において、膜タンパク質や分泌タンパク質を小胞体へとリクルートする RNA- タンパク質複合体であるシグナル認識粒子 (Signal Recognition Particle: SRP) の RNA 成分である。

出芽酵母において、SRP RNA は CRM1 とよばれる核外輸送因子により輸送されることが示されている。一方で、脊椎動物においても、ラットの培養細胞を CRM1 の阻害剤で処理すると SRP RNA が核に蓄積することから、出芽酵母と同様に CRM1 が SRP RNA を輸送すると予想されていた。しかしながら上述のラットの培養細胞を用いた実験において、CRM1 阻害の間接的な影響により SRP RNA が核に蓄積した可能性は排除できず、CRM1 が SRP RNA の核外輸送因子であるかどうかは不明瞭であった。そのため、脊椎動物における SRP RNA の核外輸送機構は、核外輸送因子の実体からして、ほとんど未知の状態にあった。そこで、我々は脊椎動物における SRP RNA の核外輸送機構の解明を目的として研究を開始した。まず脊椎動物において SRP RNA の核外輸送が CRM1 に依存しているかどうか、RNA 輸送研究においてよく用いられるアフリカツメガエル卵母細胞への微量注入系を用いて解析した。

その結果、脊椎動物において SRP RNA の核外輸送が CRM1 に依存していないことを見出した。次に、脊椎動物における SRP RNA の核外輸送因子を同定するために、様々な RNA を用いた cross-competition assay を行った。その結果、SRP RNA は pre-miRNA や tRNA と共通した因子により輸送されることが示唆された。そのため、pre-miRNA や tRNA の核外輸送因子である Exportin-5 が SRP RNA の核外輸送因子の候補として浮上した。

そこで、Exportin-5 が SRP RNA の核外輸送因子であるかどうかを調べるために、以下の実験を行った。まず、Exportin-5 のリコンビナントタンパク質または Exportin-5 に対する抗体を卵母細胞の核に注入して SRP RNA の核外輸送に与える影響を調べた。その結果、リコンビナントタンパク

質の注入により SRP RNA の輸送は促進される一方、抗体の注入により SRP RNA の輸送は阻害された。

次に、ビオチン化した SRP RNA を HeLa 細胞核抽出液と混和後にプルダウンする実験を行った。その結果、Exportin-5 が輸送基質と結合するために必要とする cofactor である RanGTP の存在下において CRM1 ではなく Exportin-5 が沈降したことから、SRP RNA は Exportin-5 と相互作用することが示唆された。以上の結果から、脊椎動物における SRP RNA の核外輸送因子は Exportin-5 であることが示唆された。

本研究から、Exportin-5 がどのようにして SRP RNA を認識するのか、なぜ出芽酵母と脊椎動物で SRP RNA の核外輸送因子が異なるのかといった問題が新たに浮上した。これらに関して考察を行った。以上の結果を論文投稿し受理された。

4. ショウジョウバエにおける RNA polymerase II 転写産物の仕分け機構の解析

真核細胞では多くの種類の RNA が核内で転写された後、細胞質へと輸送される。この際、異なる RNA 種には異なる輸送複合体が形成されるが、これはそれぞれの RNA 種が核内で識別されることを意味している。しかし、この識別の分子メカニズムは未知な部分も多い。中でも spliceosomal U snRNA と mRNA は RNA polymerase II によって転写されるなどいくつかの共通点を持っていて、両者の識別機構は長らく不明であった。我々の研究室はこの識別機構に関して、mRNA が U snRNA に比べて長いことに着目して研究を進めた。そして、脊椎動物では RNA の長さが両者の識別に重要であること、その長さを測る因子として hnRNP C が働くことを以前明らかにした。

ショウジョウバエでは、脊椎動物と同様に U snRNA の成熟過程で核外輸送が行われるので、U snRNA と mRNA 間の識別は重要であるはずである。ところが、ショウジョウバエは hnRNP C の明確なホモログを持たない。そこで本研究ではショウジョウバエにおける U snRNA/mRNA の識別機構の解明を試みた。U snRNA の輸送因子である CBC と PHAX のレコンビナントタンパク質と様々な長さの RNA を用いて、hnRNP C を同定した時と同様のアッセイを行ったところ、ショウジョウバエ S2 細胞破碎液中に、長い RNA から優先的に PHAX を除去する活性を見出した。このことからショウジョウバエにおいても U snRNA/mRNA の識別は RNA の長さに応じて行われていることが強く示唆された。現在我々は S2 細胞破碎液中からこの識別を担う責任因子の同定を試みている。

II. RNP の品質管理

細胞は正しい RNP を作るために多大なエネルギーコストを払っているが、リボソームやスプライセオソームのような巨大で複雑な RNP の場合、合成の過程で異常な RNP が生成してしまうことも珍しくないだろう。一方、遺伝子 DNA の突然変異あるいは紫外線や化学物質、活性酸素などの

様々な環境ストレスにより、完成品 RNP 中の RNA あるいはタンパク質成分が変異したり損傷を受けたりすることもあるだろう。このような原因で異常な RNP が生成してしまったときに、細胞はそれらをどのように処理するのであろうか。RNA 分子の品質管理の研究は盛んに行われているが、実は RNP の品質管理という観点から行われた研究は多くなく、その理解はようやく端緒についたばかりである。本研究室では、リボソーム粒子をモデル系として、RNP の品質管理機構を探っている。

出芽酵母で活性中心に点突然変異を持つようなリボソーム RNA は、生合成過程での品質管理機構に引っかからず、完成品リボソーム粒子にまで組み立てられる。25S rRNA の PTC (peptidyl transferase center、ペプチド転移活性中心) に点変異を持つものは完成品の大 (60S) サブユニットまで、18S rRNA の decoding center (暗号解読センター) に点変異を持つものは完成品の小 (40S) サブユニットまでそれぞれ組み立てられるが、いずれも翻訳のための活性は失っている。このような一見正常だが機能喪失した完成品リボソーム中の rRNA は、総称して NRD (non-functional rRNA decay) と呼ばれる RNA 品質管理機構で分解される。

1. 機能不全リボソームの分解に関わるユビキチンリガーゼ複合体の解析

60S リボソーム中の 25S rRNA の NRD (25S NRD) には、Rtt101 と Mms1 からなる Cullin 型 E3 ユビキチンリガーゼによるリボソームのユビキチン化が必要である。60S リボソームの処理にはまずユビキチン-プロテアソーム系によるリボソームタンパク質の分解が必要だと考えられた。

リボソームの品質管理機構の解明のため、リボソームのユビキチン化に注目して研究を開始した。Rtt101-Mms1 E3 リガーゼ複合体は、機能不全リボソームを認識するレセプタータンパク質を備えていると考えられるが、その正体はわかっていない。このレセプタータンパク質の探索のため、Mms1 との物理的相互作用が知られているタンパク質の中から 25S NRD に必要なものがあるかを調べた。その結果、Crt10 という WD40 リピートをもつタンパク質が 25S NRD に必要であることを発見した。Crt10 は Rtt101-Mms1 からなる E3 リガーゼ複合体と協力して、機能不全リボソームをユビキチン化することが確認された。

しかし、Rtt101-Mms1-Crt10 複合体とリボソームとの物理的相互作用は実験的に検出することができなかった。そのため、両者をつなぐ新たな因子が存在する可能性を考え、Mms1 と Crt10 の二段階免疫沈降により、新たな因子の同定を試みた。質量分析の結果、Paf1 Complex (Paf1C) と呼ばれる転写調節複合体が強く結合していることがわかった。Paf1 は、1996 年に RNA polymerase II に結合するタンパク質として同定され、ヒストン修飾酵素など、転写を調節する様々な因子が結合するプラットフォームとして機能すると考えられている。Paf1C によって発現量が制御される遺伝子は細胞周期・ストレス応答関連遺伝子など数多い。しかし、Paf1C は 25S NRD に関与しないことがわかった。Crt10 を含む E3 リガーゼ複合体は、Paf1C を介して 25S NRD 以外の働きをしていると予

想される。

Rtt101-Mms1 複合体は Mms22 と結合し、Mms22 は DNA 修復に関わることが知られている。Mms22 と Crt10 は相互排他的に Mms1 に結合する。mms1 Δ 株や rtt101 Δ 株、mms22 Δ 株が DNA 変異原に感受性となるのに対し、crt10 Δ 株では野生株と変わらなかった。この結果は、Crt10 の関与する 25S NRD が、DNA 修復とは遺伝的に別個の経路であることを示している。

核酸にダメージを与えるストレス下では多種の問題が発生するが、Rtt101-Mms1 からなる E3 リガーゼ複合体は多数のアダプタータンパク質を使い分けることで、一斉に対処することができる。本研究により、Crt10 がこの E3 リガーゼ複合体を 25S NRD に適用させるがわかった。さらに Crt10 が Paf1 と結合することから、転写中の DNA や RNA に障害が生じた場合に、この複合体が Crt10 と Paf1C を介して転写を制御する可能性を示唆している。以上の結果を論文投稿し受理された。

2. 機能不全リボソーム粒子の分解機構

25S rRNA には、PTC 以外にも重要なドメインが存在する。それらのドメインに変異を持つ 25S rRNA が、真核細胞中でどう処理されるかは今まで調べられてこなかった。25S rRNA の Sarcin-Ricin Loop (SRL) や 40S サブユニットとの会合に必要なブリッジ部位に変異を導入し、それらの変異が 25S rRNA の機能や安定性に与える影響を調べた。ほとんどの変異 25S rRNA は 60S サブユニットに組み込まれたが、機能を喪失する変異 rRNA の場合にはその細胞内での安定性が大きく低下した。これらの結果は、細胞の品質管理機構が 60S の多様な欠陥を認識できることを示している。現在、SRL の変異体のひとつに着目し、その分解に関与する因子の遺伝学的スクリーニングを行っている。

Laboratory of Biological Protection

Members

Professor	Koichi Ikuta
Assistant Professor	Shizue Tani-ichi
	Takahiro Hara
Graduate Student	Soichiro Shitara, Guangwei Cui, Akihiro Shimba

Introduction

Our laboratory has made two major achievements. First, we have found that fetal and adult hematopoietic stem cells have different developmental potential to differentiate into lymphocytes. Second, we have demonstrated that interleukin-7 (IL-7) controls DNA recombination of lymphocyte antigen receptor genes by changing chromatin structure. Both of them are related with fundamental questions in medicine and biology. Based on these findings, we are now pursuing research on development and regulation of the immune system, focusing on the following questions: (1) function of IL-7 receptor (IL-7R) in immune system; (2) control mechanism of lymphocyte antigen receptor genes by IL-7; (3) regulation of immune response by IL-7R expression; and (4) distribution and function of IL-7- and IL-15-producing cells in lymphoid organs.

Topics

1) Characterization of the interleukin-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo: G. CUI, T. HARA, S. SIMMONS¹, K. WAGATSUMA, A. ABE, H. MIYACHI², S. KITANO², M. ISHII¹, S. TANI-ICHI, and K. IKUTA (¹Osaka University, ²Reproductive Engineering Team, IVR)

IL-15 is a cytokine critical for development, maintenance, and response of T cells, NK cells, NKT cells, and dendritic cells. However, the identity and distribution of IL-15-expressing cells in lymphoid organs are not well understood. To address these questions, we established and analyzed IL-15-CFP knock-in mice. We found that IL-15 was highly expressed in thymic medulla, and MHC-II^{high} medullary thymic epithelial cells were the major source of IL-15. In bone marrow, IL-15 was detected primarily in VCAM-1⁺PDGFR β ⁺CD31⁻Sca-1⁻ stromal cells, which corresponded to CXCL12-abundant reticular cells. In lymph nodes, IL-15-expressing cells were mainly distributed in the T-cell zone and medulla. IL-15 was expressed in some fibroblastic reticular cells and gp38⁻CD31⁻ double-negative stromal cells in the T-cell zone. Blood

endothelial cells, including all high endothelial venules, also expressed high IL-15 levels in lymph nodes, whereas lymphatic endothelial cells lacked IL-15 expression. In spleen, IL-15 was expressed in VCAM-1⁺ stromal cells, where its expression increased as mice aged. Lastly, IL-15 expression in blood and lymphatic endothelial cells of peripheral lymphoid organs significantly increased in LPS-induced inflammation. Overall, we have identified and characterized several IL-15-expressing cells in primary and secondary lymphoid organs, providing a unique perspective of IL-15 niche in immune microenvironment. This study also suggests that some stromal cells express IL-7 and IL-15 differentially and suggests a way to functionally classify different stromal cell subsets.

List of publications

Cui, G., Hara, T., Simmons, S., Wagatsuma, K., Abe, A., Miyachi, H., Kitano, S., Ishii, M., Tani-ichi, S., and Ikuta, K. (2014). Characterization of the interleukin-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, *111*, 1915-1920.

Tsuneto, M., Kajikhina, E., Seiler, K., Reimer, A., Tornack, J., Bouquet, C., Simmons, S., Knoll, M., Wolf, I., Tokoyoda, K., Hauser, A., Hara, T., Tani-Ichi, S., Ikuta, K., Grün, J. R., Grützkau, A., Engels, N., Wienands, J., Yanagisawa, Y., Ohnishi, K., and Melchers, F. (2014). Environments of B cell development. **Immunol. Lett.**, *157*, 60-63.

生田宏一：(2014)、肝細胞が産生する IL-7 の機能、**医学のあゆみ**、*248*, 615-616.

谷一靖江、原崇裕、生田宏一：(2014)、T 細胞における IL-7 レセプターの転写制御と機能、**臨床免疫・アレルギー科**、*61*, 450-456.

谷一靖江、生田宏一：(2014)、後期 T 細胞分化における IL-7R の機能、**医学のあゆみ**、*250*, 226-227.

生田宏一、崔広為：(2014)、IL-15 産生細胞の可視化-免疫系の微小環境の解明に期待、**医学のあゆみ**、*251*, 245-246.

Cui, G., Hara, T., Simmons, S., Wagatsuma, K., Abe, A., Ishii, M., Tani-ichi, S., and Ikuta, K.: Identification and characterization of IL-15-expressing cells in vivo. The 9th International Symposium of the Institute Network, Osaka, 19 June, 2014.

生田宏一：Visualizing immune microenvironment by reporter mice、徳島大学疾患酵素学研究センターセミナー、徳島、2014 年 1 月 16 日

谷一靖江、生田宏一：末梢組織でのガンマデルタ T 細胞維持における TCR シグナルの必要性、第 24 回 Kyoto T Cell Conference、京都、2014 年 5 月 17 日

生田宏一：免疫微小環境の可視化と機能解析、第 1 回免疫代謝セミナー、富山、2014 年 7 月 31 日

榛葉旭恒、谷一靖江、増田喬子、原崇裕、河本宏、生田宏一：Differential roles of IL-7 and IL-2 receptor signals in lymphocyte development and maintenance revealed by IL-7R α /IL-2R β chimera knock-in mice、第 43 回日本免疫学会学術集会、京都、2014 年 12 月 10 日

西嶋仁、森本純子、毛利安宏、河野弘、生田宏一、松本満：Approaches to identify Aire-regulated non-tissue-restricted antigen genes by the ectopic expression of Aire in thymic cortex、第 43 回日本免疫学会学術集会、京都、2013 年 12 月 10 日

原崇裕、崔広為、生田宏一：Distribution and function of IL-7- and IL-15-expressing cells in intestines、第 43 回日本免疫学会学術集会、京都、2014 年 12 月 12 日

設楽宗一郎：Evidence for the thymic origin of $\gamma\delta$ IEL、平成 26 年度京都大学ウイルス研究所学術交流会、京都、2013 年 12 月 22 日

教授	生田宏一
助教	谷一靖江 原崇裕
大学院生	設楽宗一郎、崔広為、榛葉旭恒

今年は3月に阿部昌史さんが生命科学研究科大学院博士課程を修了して就職した。したがって、生体防御研究分野は現在、教授1名、助教2名、大学院生3名の総勢6名となっている。

本分野では、造血幹細胞からの免疫系細胞の初期分化の分子機構、および免疫応答の制御機構を解明することを通じ、細胞分化の普遍的な原理を明らかにすることを目指している。特に、インターロイキン7レセプター (IL-7R) の免疫系における機能、IL-7 による T 細胞抗原受容体 (TCR) 遺伝子の制御、IL-7R の発現制御、IL-7 と IL-15 産生細胞の可視化と機能解析を中心に研究を進めている。本年に論文として発表した研究成果を以下に記載する。

1) IL-15 産生細胞の可視化

免疫組織はリンパ球と免疫微小環境から成り、微小環境は上皮細胞、内皮細胞、細網細胞などのストローマ細胞から構成されている。ストローマ細胞はサイトカイン、ケモカイン、接着分子などを産生し、リンパ球の分化、維持、応答に大きな役割を担っている。このサイトカインの一つに IL-15 があり、T 細胞、NKT 細胞、NK 細胞、樹状細胞の分化、維持、機能に重要な働きをしている。IL-15 mRNA はリンパ組織をはじめとして多くの器官で検出されるが、IL-15 産生細胞の実態については長く不明のままであった。そこで、IL-15 遺伝子座に CFP cDNA をノックインした IL-15-CFP KI マウスを作製し、生体内における IL-15 産生細胞の分布を解析した。骨髄では主に血管周囲に存在する VCAM-1 陽性の間葉系ストローマ細胞に IL-15 の発現が見られた。胸腺では MHC クラス II を強く発現する成熟した胸腺髄質上皮細胞に IL-15 の発現が検出された (図 1)。リンパ節では T 細胞領域の細網線維芽細胞や樹状細胞が IL-15 を産生していた。さらに、高内皮性細静脈とすべての血管内皮細胞で IL-15 が検出された (図 1)。脾臓では VCAM-1 陽性のストローマ細胞の一部が IL-15 を発現しており、その発現細胞は加齢とともに増加した。また、LPS を投与して炎症を惹起すると、血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞の IL-15 産生が亢進することを見出した。以上の結果から、生体内の IL-15 産生性ストローマ細胞を初めて同定し、その特徴的な分布と発現様式を明ら

かにした (Cui et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 111:1915, 2014)。

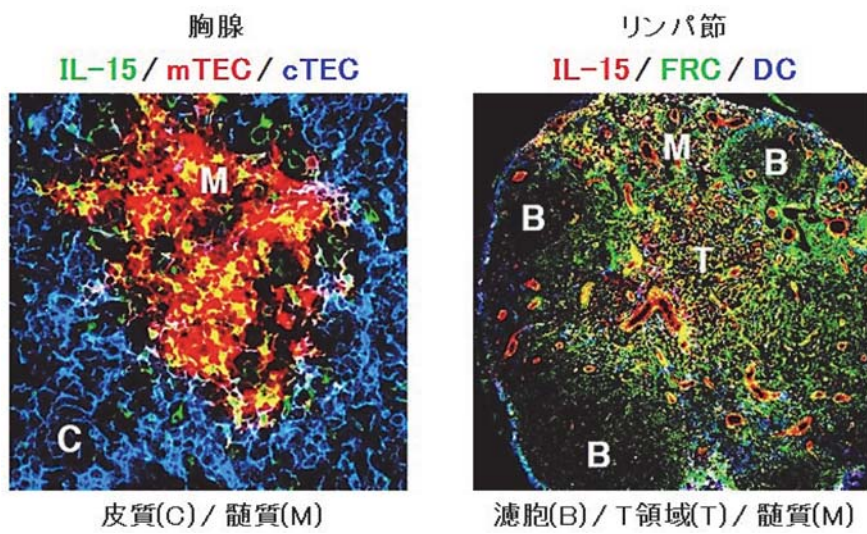


図 1. IL-15 産生細胞の分布



Laboratory of Infection and Prevention

I. First Group

Members

Professor	Osamu Takeuchi
Assistant Professor	Takashi Mino
Office Administrator	Momoko Tsuji
Postdoctoral Fellow	Atsuko Wakabayashi
	Daisuke Ori
	Tomoko Imamura
	Sarang Tartey
Graduate Student	Yoshinari Nakatsuka, Masaki Abe, Miya Haruna,
	Hiroto Wakabayashi, Kae Hatano
Research Student	Masanori Yoshinaga

Introduction

The research projects carried out in this group are aiming to uncover the molecular mechanisms of the regulation of inflammation in innate immunity. Since inflammation is mediated by the production of proinflammatory cytokines, we are studying the cytokine gene expression at the transcriptional and posttranscriptional levels.

Topics

1) Regulatory mechanism for the Regnase-1-mediated mRNA decay in innate immunity and its post-transcriptional regulation: T. MINO, T. IMAMURA, D. ORI, Y. NAKATSUKA, M. ABE, M. HARUNA, M. YOSHINAGA and O. TAKEUCHI

Gene expression in response to inflammatory stimuli is controlled by the transcriptional and post-transcriptional mechanisms in immune cells. Post-transcriptional regulation that modifies mRNA stability and translation provides rapid and flexible control of gene expression. Control of mRNA stability is mediated by a set of RNA binding proteins including Tristetraprolin, Roquin and Regnase-1. Roquin (RING finger and CCCH zinc finger protein) prevents development of autoimmunity in mice by destabilizing the mRNA such as *inducible T cell costimulator (Icos)* and *tumor necrosis factor (Tnf)*. We have previously identified an RNase Regnase-1 (also known as Zc3h12a, Mcpip1) degrades mRNAs such as *Interleukin-6 (Il6)* and

Regnase-1 itself, and plays a critical role in preventing autoimmunity in mice. Regnase-1 is shown to control not only innate immune cells, but also acquired immune cells for maintaining the homeostasis. However, the target specificity of Regnase-1 as well as the molecular mechanisms by which Regnase-1 degrades its target mRNAs are not yet understood. In this study, we demonstrate that although Regnase-1 and Roquin regulate an overlapping set of mRNAs via a common stem-loop structure, they function in distinct subcellular locations: ribosome/endoplasmic reticulum (ER) and processing-body (PB)/stress granules (SGs), respectively. We investigated Regnase-1 and Roquin target mRNAs by RNA-immunoprecipitation sequencing (RIP-Seq) and gene set enrichment analysis (GSEA) showed that Regnase-1 target mRNAs identified by Regnase-1 RIP-seq were significantly biased toward high enrichment scores in the Roquin RIP-seq data. Reciprocally, a set of Roquin target mRNA identified by Roquin RIP-seq showed a significant overlap with mRNAs enriched in the Regnase-1 RIP-seq data, indicating that the Regnase-1 and Roquin target mRNAs overlap significantly. Next, we investigated target structures present in 3' UTRs of Regnase-1 binding mRNAs globally by using high-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation (HITS-CLIP) and the Regnase-1 binding sequences identified by HITS-CLIP are predicted to form stem-loops, and the sequences were found to be suppressed by Regnsae-1. The stem-loop structures with 3-7 nucleotide length stems with 3 or 4 nucleotide loops were significantly enriched in Regnase-1 binding sequences. Interestingly, the UAU sequence was significantly enriched in the hairpin sequences. These data clearly demonstrate that stem-loop sequences with varying stem lengths (3-7 nucleotides) with UAU triloops preferentially associate with Regnase-1. By performing a luciferase reporter assay, we found that the stem-loop needs to harbor at least one GC pair, more than 2 stem lengths and UAU/UGU loop sequences to be suppressed by Regnase-1, consistent with the enrichment of stem-loops with various stem lengths (3 to 7 nucleotides) in CLIP analysis of Regnase-1 binding sites. Interestingly, this rule is consistent with that in the reported Roquin target mRNAs and we found that Roquin destabilized mRNAs with Regnase-1 target stem-loop sequences by a luciferase reporter assay. Taken together, these results demonstrate that Regnase-1 and Roquin recognize overlapping target mRNAs via the same stem-loop structures present in their 3' UTRs. Whereas Roquin localized to SGs and PB, which is cytoplasmic foci known to be involved in the posttranscriptional processing of translationally inactive mRNAs, Regnase-1 localized to cytoplasm and ER, but not to PB and SGs, and colocalizes with ribosome. Regnase-1 destabilized translationally active mRNAs and a stop codon was required for the Regnase-1-mediated mRNA decay. The apparent cooperation between Regnase-1 and Roquin proteins was confirmed by the upregulation of their mutual target mRNAs under mutations of both Regnase-1 and Roquin, although Regnase-1 and Roquin tend to control the early and late phase of inflammation, respectively and function in distinct subcellular locations. Thus, a common stem-loop RNA structure is recognized by distinct proteins in different stages of mRNA metabolism for fine tuning immune responses.

2) Role of Akirin2 in Toll-like receptor-mediated cytokine gene expression in macrophages: S. TARTEY, A. WAKABAYASHI, H. WAKABAYASHI, K. HATANO and O. TAKEUCHI

Recognition of microbial components via Toll-like receptors (TLRs) leads to the activation of a set of transcription factors including NF- κ B and AP-1 for inducing proinflammatory cytokine genes. In addition, transcription of inflammatory genes in innate immune cells is coordinately regulated by transcription factors and chromatin modifiers. However, it remains unclear how microbial sensing initiates chromatin remodeling. Here we show that Akirin2, an evolutionarily conserved nuclear protein, bridges NF- κ B and the chromatin remodeling SWI/SNF complex by interacting with BRG1 Associated Factor 60 (BAF60) proteins as well as I κ B- ζ , which forms a complex with the NF- κ Bp50 subunit. These interactions are essential for Toll-like receptor-, RIG-I- and Listeria-mediated expression of proinflammatory genes including Il6 and Il12b in macrophages. Consistently, effective clearance of Listeria infection required Akirin2. Akirin2 (I κ B- ζ) recruitment to the Il6 promoter upon LPS stimulation was found to depend on I κ B- ζ (Akirin2) and NF- κ Bp50 subunit, where it regulates chromatin remodeling and histone modification. BAF60 proteins were also essential for the induction of Il6 in response to LPS stimulation. Collectively, the I κ B- ζ -Akirin2-BAF60 complex physically links the NF- κ B and SWI/SNF complexes in innate immune cell activation.

List of Publications

Bonnay, F., Nguyen, X.H., Cohen-Berros, E., Troxler, L., Batsche, E., Camonis, J., Takeuchi, O., Reichhart, J.M., Matt, N. (2014). Akirin specifies NF- κ B selectivity of Drosophila innate immune response via chromatin remodeling. **EMBO J.** 33, 2349–2362.

Tartey, S., Matsushita, K., Vandenbon, A., Ori, D., Imamura, T., Mino, T., Standley, D.M., Hoffmann, J.A., Reichhart, J.M., Akira, S., Takeuchi, O. (2014). Akirin2 is critical for inducing inflammatory genes by bridging I κ B- ζ and the SWI/SNF complex. **EMBO J.** 33, 2332–2348.

Kuniyoshi, K., Takeuchi, O., Pandey, S., Satoh, T., Iwasaki, H., Akira, S., Kawai, T. (2014). Pivotal role of RNA-binding E3 ubiquitin ligase MEX3C in RIG-I-mediated antiviral innate immunity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 111, 5646–5651.

Imanishi, T., Ishihara, C., Badr Mel, S., Hashimoto-Tane, A., Kimura, Y., Kawai, T., Takeuchi, O., Ishii, K.J., Taniguchi, S., Noda, T., Hirano, H., Brombacher, F., Barber, G.N., Akira, S., Saito, T. (2014). Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation. **Nat. Commun.** 5, 3566.

Vandenbon, A., Teraguchi, S., Takeuchi, O., Suzuki, Y., Standley, D.M. (2014). Dynamics of enhancers in

myeloid antigen presenting cells upon LPS stimulation. **BMC Genomics** 15, S4.

Tartey, S., Takeuchi, O. (2014). Toll-Like Receptors: Cancer and Inflammation. Cancer and Inflammation Mechanisms: Chemical, Biological, and Clinical Aspects, John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-1-118-16030-5.

若林敦子, 竹内理. (2014). 自然免疫と自己免疫疾患. **細胞** 46 (10), 469–474.

阿部壮岐, 竹内理. (2014). M1, M2 マクロファージ分化機構と炎症. **炎症と免疫** 22 (5), 81–85.

竹内理. (2014). 機能的マクロファージサブセット分化の分子機構. **実験医学増刊 炎症 — 全体像を知り慢性疾患を制御する** 32 (17).

竹内理. (2014). 自然免疫. **臨床血液** 55 (10), 2175-2182.

Takeuchi O.: "Posttranscriptional regulation of inflammatory responses", Seminar in Washington University, Washington, USA. 23 January, 2014

Takeuchi O.: "Posttranscriptional regulation of inflammatory responses", BIMS seminar, Berlin, Germany, 11 February, 2014

Imamura, T. and Takeuchi, O.: "N4bp1-mediated nuclear RNA decay controls cytokine mRNA expression", The 21st East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Seoul, Korea, 17–18 July, 2014.

Takeuchi O.: "Posttranscriptional control of inflammation by an RNase, Regnase-1", Molecular Clock 2014, Kyoto, 29 February, 2014,

竹内 理: "Posttranscriptional regulation of inflammation by an RNase, Regnase-1", 第 87 回日本薬理学会年会、仙台、2014 年 3 月 19–21 日 .

竹内 理: "炎症制御の分子メカニズム—mRNA 分解の役割を中心に—", 第 14 回日本抗加齢医学会総会、大阪、2014 年 6 月 6–8 日 .

竹内 理: "Toll-like receptor 活性化による炎症応答の転写後調節機構", 第 87 回日本生化学会大会シンポジウム、京都、2014 年 10 月 17 日 .

竹内 理："教育講演 57「自然免疫」第 76 回日本血液学会学術集会"、大阪、2014 年 11 月 1 日。

Mino, T., Fukao, A., Fujiwara, T. and Takeuchi, O.: "Regnase-1 destabilizes inflammation-related mRNAs in a translation-dependent manner", The 16th RNA meeting of the RNA Society of Japan, Nagoya, Japan, 23–25 July, 2014.

阿部壮岐、三野享史、村川泰裕、竹内理："Regnase-1 標的 mRNA 配列の網羅的同定"、RNA フロンティアミーティング 2014、和歌山県西牟婁郡白浜町、2014 年 9 月 16–18 日。

Tartey, S., Akira, S. and Takeuchi, O.: "Akirin2 is essential for inducing inflammatory genes in macrophages by bridging I κ B- ζ and the SWI/SNF complex", 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Nara, Japan, 23–26 September, 2014.

Mino, T., Fukao, A., Fujiwara, T. and Takeuchi, O.: "Regnase-1 destabilizes inflammation-related mRNAs in a translation-dependent manner", The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, Japan, 25–27 November, 2014.

Mino, T. and Takeuchi O.: "Regnase-1 destabilizes inflammation-related mRNAs in a translation-dependent manner", The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Kyoto, Japan, 10–12 December, 2014.

Imamura, T. and Takeuchi O.: "N4bp1-mediated nascent RNA decay controls cytokine mRNA expression", The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Kyoto, Japan, 10–12 December, 2014.

Tartey, S., Akira, S. and Takeuchi, O.: "Novel Cyclin controls neoplastic alterations and bacterial infection by regulating neutrophil homeostasis", The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Kyoto, Japan, 10–12 December, 2014.

Yoshinaga, M., Mino, T. and Takeuchi O.: "A novel role of Regnase-1 in the iron homeostasis and anemia", The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Kyoto, Japan, 10–12 December, 2014.

II. Second Group

Members

Associate Professor

Hiroshi Masutani

Graduate Student

Cristiane Lumi Hirata

Introduction

The research projects carried out in this group are studies on α -arrestin family proteins including thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) also referred as thioredoxin interacting protein (Txnip) or Vitamin D3 up-regulated protein 1 (VDUP1). Txnip/ TBP-2 has attracted much attention as a multifunctional regulator in cancer suppression, energy metabolism, vascular stress, as well as immune response and inflammation. Txnip also acts as a negative regulator of thioredoxin. The other subject is redox signaling and host defense mechanism against oxidative stress. Thioredoxin is a key component of redox regulation and plays a protective role in various diseases, associated with oxidative stress and inflammation.

Topics

Thioredoxin interacting protein (Txnip)/ TBP-2 is a crossroads regulator of cancer and metabolism: H. MASUTANI and C. L. HIRATA

Txnip expression is decreased or silenced in many cancer cells and various cancer tissues. Txnip/ TBP-2^{-/-} mice are much more susceptible to carcinogenesis than wild-type mice, indicating a role for Txnip in cancer suppression. Txnip regulates TGF-beta signaling and Epithelial-Mesenchymal transition. Recently, a multi-organization genome study revealed that mutation of Txnip gene is found in cancer samples from several percent of bladder cancer patients. Therefore, Txnip seems to be an important target of cancer research. We have further investigated the molecular mechanism of cancer suppression by Txnip. We identified several candidates of interacting proteins of Txnip in MCF7 breast cancer cells by proteomics approaches, providing an insight for the pleiotropic character of Txnip. Meanwhile, Txnip plays essential roles in metabolic energy control. We previously showed that disruption of Txnip dramatically improves hyperglycemia, by enhanced insulin sensitivity in skeletal muscle and augmented glucose-induced insulin secretion in beta cells. We showed that the expression of Txnip is tightly regulated by glucose stimulation both transcriptionally and at a protein level in cancer cells and muscle cells. We have shown the regulatory mechanism of Txnip expression by chemical biology approaches. Silencing of Txnip expression found in many cancer cells is thought to be advantageous for cancer cells to escape from suppressive effect by glucose-induced Txnip.

List of Publications

Taketani, Y., Kinugasa, K., Kitajima, R., Nishiumi, S., Ashida, H., Nakamura, H., Fujita, T., Kanzaki, K., Masutani, H., Yodoi, J. (2014). Protective effects of oral administration of yeast thioredoxin against gastric mucosal injury. **Biosci Biotechnol Biochem.** 78, 1221-1230.

増谷 弘： (2014) 生体の抗酸化システム④、チオレドキシン周辺分子、酸化ストレスの医学、改訂第二版、44-52

Masutani, H., Hirata, C.L.: Development of redox modulating approaches against cancer and diabetes by Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) /Txnip. 17th biennial meeting of society for free radical research international, Kyoto, 23-26 March, 2014.

Hirata, C.L., Masutani, H.: Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) is a multifunctional biostress signal regulator. 17th biennial meeting of society for free radical research international, Kyoto, 23-26 March, 2014.

Masui, S., Murakami, I., Ishii, K., Walenna, N., Chou, B., Itoh, R., Masutani, H., Hiromatsu, K.: *Chlamydia pneumoniae*-induced ER stress activates NLRP3 inflammasome via TXNIP. The 43rd annual meeting of the Japanese society for immunology, Kyoto, 10-12 December, 2014.

I. First Group

教授	竹内 理
助教	三野 享史
秘書	辻 桃子
博士研究員	若林 敦子
	織 大祐
	今村 智子
	Sarang Tartey
大学院生	中塚 賀也, 阿部 壮岐, 春名 美弥, 若林 寛人, 波多野 華恵
研究生	吉永 正憲

当研究室には、平成 25 年 11 月に博士研究員の Sarang Tartey が参加し、4 月に医学研究科博士課程 2 年の中塚 賀也和生命科学科修士課程 1 年の波多野 華恵が新たに加わり、8 月に秘書の辻 桃子が新たに加わった。

竹内は、1 月にワシントン大学、2 月にベルリン BIMS Seminar Series において招待講演を行った。また、3 月に日本薬理学会（仙台）、Molecular Clock 国際シンポジウム（京都）、6 月に抗加齢学会（大阪）、10 月に日本生化学会、11 月に日本血液学会において招待講演を行い、11 月に日本分子生物学会ワークショップにて発表を行った。また、今村は韓国で開催された第 21 回東アジアシンポジウムで発表を行い、Outstanding Young Scientist 1st Place TOMY Award を受賞した。その他、教室員の多くが、日本免疫学会学術集会（京都）等の学会で発表した。

我々の研究室では、自然免疫の観点から炎症の惹起・調節に関わる分子メカニズムの研究を行っている。特に、遺伝子改変マウスの作製および解析と分子生物学的な手法によって研究を進め、炎症を制御しているシグナル伝達や転写後調節の解明を試みている。今年度の成果および研究活動は以下の通りである。

1) 炎症の転写後調節における Regnase-1 の作用機構

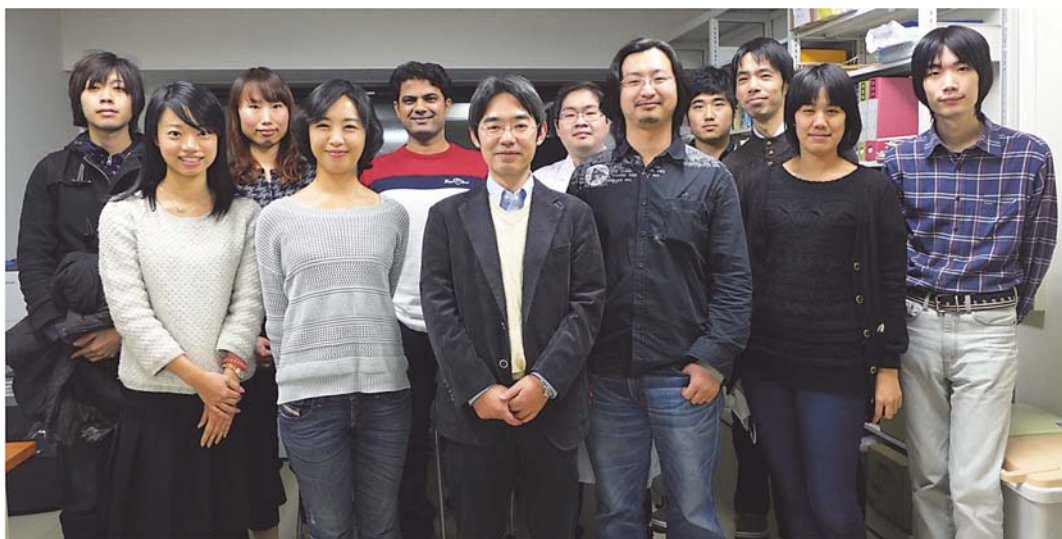
免疫刺激に対する遺伝子発現は、転写および転写後調節により厳密に制御されている。中でも RNA の安定性や翻訳を制御する転写後調節は遺伝子発現を制御する重要なプロセスの一つであり、Tristetraprolin, Roquin および Regnase-1 などの RNA 結合タンパク質による転写後調節は炎症などの

免疫応答の開始や終結の制御にも重要である。Roquin (Rc3h1, Rc3h2, RING finger and CCCH zinc finger protein) は *Icos* や *Tnf* mRNA 分解を誘導することで自己免疫疾患となることを防いでいることが知られている。また、これまで我々の研究室では、新規 RNase である Regnase-1 (Zc3h12a, Mcpip1) が *Interleukin-6* (*Il6*) や *IL12p40* などのサイトカイン mRNA の分解を行うことで過剰な免疫応答を抑制するサイトカイン産生のブレーキ役を担っている事を見いだした。また, Regnase-1 はマクロファージなどの自然免疫担当細胞だけでなく, 獲得免疫 T 細胞において *c-Rel* や *Icos*, *Ox40*, *Il2* などの mRNA を分解することによって過剰な T 細胞活性化を抑制していることを報告した。しかしながら, Regnase-1 の標的 mRNA の特異性や作用機構はほとんど分かっていない。本年は, Regnase-1 は Roquin と共通の stem-loop 構造を認識して, RNA helicase UPF1 依存的にタンパク質翻訳の終結反応 (translation termination) と共役し translationally active mRNA を分解していることを明らかにした。Regnase-1 の標的 mRNA の特異性を検証するために, Regnase-1 結合 mRNA を RIP-sequence により網羅的に同定し, Regnase-1 の結合領域を HITS-CLIP により網羅的に同定し, 更に Regnase-1 に対する応答領域を同定した結果, Regnase-1 は stem-loop 構造を認識して RNA 分解を生じていることが分かった。その stem-loop 構造は 3-7 塩基の stem 構造と 3 あるいは 4 塩基の loop 構造を有することが分かった。興味深いことに, Regnase-1 は UAU/UGU loop 配列を分解することが分かった。この stem-loop 構造は Roquin が認識する stem-loop 構造と非常に似ていた。そこで, Regnase-1 と Roquin の標的配列が重なっているか検討するために, Roquin 結合 mRNA を RIP-sequence により網羅的に同定し, Regnase-1 結合 mRNA と Roquin 結合 mRNA の相関を gene set enrichment analysis (GSEA) により統計的に解析した。その結果, Regnase-1 結合 mRNA と Roquin 結合 mRNA は統計的に重なっていることが分かった。更に, Roquin は Regnase-1 の標的 stem-loop 構造に対して RNA 分解を誘導した。これは Regnase-1 と Roquin の標的配列が重なっており, Regnase-1 と Roquin が RNA 分解能において重複性を有することを示唆している。そこで, Regnase-1 と Roquin が RNA 分解能において重複性を有するか検討するために, Regnase-1 と Roquin のダブルノックアウトマウス (Regnae-1^{-/-}/Rc3h1^{san/san} mice) の作製を試みた結果, ダブルノックアウトマウスは周産期致死であり, ダブルノックアウトのマウス胎仔由来線維芽細胞 (MEF) において Regnase-1 と Roquin の共通の標的 mRNA 量はそれぞれのノックアウト MEF よりも増加していた。この結果は Regnase-1 と Roquin は RNA 分解能において重複性を有し, この重複した mRNA 安定性制御が正常な遺伝子発現において重要であることを示唆している。次に, Regnase-1 と Roquin の細胞内局在に関し検討を加えると, Roquin は RNA 分解に関わる酵素が豊富な processing bodies (PBs) や stress granules (SGs) に局在し, Regnase-1 はサイトカインなどの分泌蛋白質の翻訳が生じている endoplasmic reticulum (ER) に多く存在し, 蛋白質合成装置であるリボソームと共局在する事が明らかとなった。Regnase-1 と Roquin の細胞内局在の違いは機能する”場”が異なることを示唆している。実際に, Regnase-1 のノックダウンは polysome の mRNA を増加させ, Roquin のノックダウ

ンは ribonucleoprotein complex (RNPs) の mRNA を増加させていた。この結果は、Regnase-1 は translationally active mRNA の状態である polysome の mRNA を分解し、Roquin は translationally inactive mRNA を分解していることを示唆している。Regnase-1 による translationally active mRNA 分解について更に検討を加えると、Regnase-1 は ribosome および直接結合する RNase であり、タンパク質翻訳の終結反応 (translation termination) と共役して RNA 分解を生じていた。更に、Regnase-1 は RNA helicase UPF1 と相互作用し、UPF1 依存的に mRNA を分解していることが分かった。以上の結果より、Regnase-1 と Roquin は共通の stem-loop 構造を認識することで空間的に異なる RNA 分解の制御因子として機能している事が明らかとなった。

2) マクロファージでの Akirin2 によるサイトカイン遺伝子発現調節における役割

マクロファージは Toll-like receptor (TLR) を始めとした受容体により病原体構成成分を認識し、細胞内シグナル伝達系を活性化させ NF- κ B や AP-1 などの転写因子を活性化させることにより炎症性サイトカイン遺伝子の転写を促す。また、この遺伝子発現は、転写因子とクロマチン調節により協調的にコントロールされている。しかしながら、自然免疫がどのようにクロマチンリモデリングを誘導しているかのメカニズムはこれまで十分わかっていなかった。今回、私たちは進化的に保存された核タンパク質である Akirin2 が、NF- κ B とクロマチンリモデリング複合体をつなぐ働きをすることを明らかにした。これは、SWI/SNF 複合体の構成タンパク質である BAF60 タンパク質と I κ B- ζ タンパク質が直接結合することにより担われている。この結合は、TLR や RIG-I 刺激、またリステリア感染に対する Il6 や Il12b といったサイトカイン遺伝子発現に必須であった。Akirin2 は NF- κ Bp50 サブユニットや I κ B- ζ 依存性に Il6 プロモーターにリクルートされ Il6 プロモーターにおいてクロマチンリモデリングやヒストンメチル化を調節した。したがって、I κ B- ζ -Akirin2-BAF60 が複合体を形成することにより、NF- κ B と SWI/SNF 複合体を物理的にリンクさせ自然免疫細胞を活性化させていることが明らかとなった。



II. Second Group

准教授

増谷 弘

大学院生

Cristiane Lumi Hirata

2014 年は、ブラジルより文部科学省国費外国人留学生 Cristiane Lumi Hirata さんが医学研究科博士課程に入学した。現在、当グループでは増谷 弘准教授の他、共同研究者として、西條美佐博士、松尾禎之博士が参加して研究を行っている。さらに藍野大学臨床工学科教授水谷陽一博士が共同研究者として参加し、2014 年は新牛込史也さんが研究に参加した。増谷准教授は 2014 年より学術振興会レドックス・ライフイノベーション第 170 委員会の委員となり、活動を行った。ウイルス研究所共同研究者として前田道之博士は、博士が樹立した多数の HTLV-I 感染細胞株の整理・保存・データベース化に携わり、研究材料の提供を行った。

1) thioredoxin ファミリーによるレドックス・酸化ストレス防御の研究と thioredoxin interacting protein (Txnip) / thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) による癌抑制とエネルギー代謝制御の crossroads 制御機構の解明

レドックス（酸化還元）調節に中心的な役割を果たし、また酸化ストレス防御や炎症抑制に作用する thioredoxin ファミリーの分子を中心として、共同研究を実施した。今年度は酵母 thioredoxin が胃粘膜障害に対して防護的に働くことをオリエンタル酵母株式会社研究所との共同研究によって報告した。また、国立精神・神経医療研究センターとの共同研究を継続している。

アルファアレスチンファミリーに属する Txnip/TBP-2 は、ウイルス感染症、免疫・炎症制御、癌抑制に関わる多機能の調節因子である。Txnip が膀胱癌においてかなりの頻度で変異が見られることが多施設解析により報告され、癌研究における Txnip の分子機構解析の重要性が示唆されている。現在医学研究科との共同研究によるプロテオミクス解析により Txnip の分子機構の解析を進めており、いくつかの候補分子を同定した。一方、Txnip はエネルギー代謝制御に重要な働きを持つ分子であることをこれまで示してきた。Txnip は転写レベルと蛋白質安定化の両方の機構で glucose により誘導される。薬学研究科との共同研究により Txnip の発現に影響を与える新規化合物を同定し、ケミカルバイオロジーによるアプローチにより Txnip 蛋白質発現調節の分子機構を示した。Txnip の癌細胞におけるサイレンシングは、glucose による Txnip の発現誘導による増殖抑制からの回避に利用されているとも考えられる。Txnip 制御による癌抑制、エネルギー代謝制御、ウイルス感染症制御への応用を目指して研究を行っている。

Laboratory of Subcellular Biogenesis

Members

Professor	Fumiko Toyoshima
Assistant Professor	Shigeru Matsumura Yukako Oda
Lab Manager	Yoko Ohta
Graduate Student	Mayumi Hamasaki, Sayaka Iwano, Riki Ishibashi Megumi Ikeda, Ryo Ichijo, Mitsuko Fukuhara Kanae Mori, Saori Yoneda, Satoshi Kouzuki Hiroki Kobayashi, Yuki Komatsuzaki, Chika Higashiura

Introduction

Oriented cell division plays an essential role in asymmetric cell division, tissue morphogenesis and organogenesis. Our group seeks to explore the molecular mechanisms underlying the determination of cell division axis in culture cells and in mouse tissues. Our research is focused on the following subjects:

- 1, Mechanisms for orientated cell division in culture cells and skin basal cells.
- 2, Symmetric and asymmetric cell division of ES cells.
- 3, Metabolism and cell division.

Topics

1) CKD family PCTK1 regulates spindle orientation: S. IWANO, A. SATOU, S. MATSUMURA, N. SUGIYAMA, Y. ISHIHAMA and F. TOYOSHIMA

Integrin-dependent cell–extra cellular matrix (ECM) adhesion is a determinant of spindle orientation. However, the signaling pathways that couple integrins to spindle orientation remain elusive. Here, we show that PCTAIRE-1 kinase (PCTK1), a member of the cyclin-dependent kinases (CDK) whose function is poorly characterized, plays an essential role in this process. PCTK1 regulates spindle orientation in a kinase-dependent manner. Phosphoproteomic analysis together with an RNA interference screen revealed that PCTK1 regulates spindle orientation through phosphorylation of Ser83 on KAP0, a regulatory subunit of PKA. This phosphorylation is dispensable for KAP0 dimerization and for PKA binding, but is necessary for its interaction with myosin X, a regulator of spindle orientation. KAP0 binds to the FERM domain of myosin

X and enhances the association of myosin X-FERM with $\beta 1$ integrin. This interaction between myosin X-FERM and $\beta 1$ integrin appeared to be crucial for spindle orientation control. We propose that PCTK1–KAP0–myosin X– $\beta 1$ integrin is a functional module providing a link between ECM and the actin cytoskeleton in the ECM-dependent control of spindle orientation.

2) Cholesterol metabolites pregnenolone functions in centriole cohesion: M. HAMASAKI, S. MATSUMURA, A. SATOU, C. TAKAHASHI, Y. ODA, C. HIGASHIURA, Y. ISHIHAMA and F. TOYOSHIMA

Cell division is controlled by a multitude of protein enzymes, but little is known about roles of metabolites in this mechanism. Here we show that pregnenolone (P5), a steroid which is produced from cholesterol by the steroidogenic enzyme Cyp11a1, has an essential role in centriole cohesion during mitosis. During prometa-metaphase, P5 is accumulated around the spindle poles. Depletion of P5 induces multipolar spindles that result from premature centriole disengagement, which are rescued by ectopic introduction of P5, but not its downstream metabolites, into the cells. Premature centriole disengagement, induced by loss of P5, is not a result of precocious activation of separase, a key factor for the centriole disengagement in anaphase. Rather, P5 directly binds to the N-terminal coiled-coil domain of short-form of shugoshin 1 (sSgo1), a protector for centriole cohesion, and recruits it to spindle poles in mitosis. Our results thus reveal a novel steroid-mediated centriole protection mechanism.

List of Publications

1. Iwano, S., Satou, A., Matsumura, S., Sugiyama, N., Ishihama, Y., and Toyoshima, F. PCTK1 regulates integrin-dependent spindle orientation via PKA regulatory subunit KAP0 and myosin X. *Mol. Cell. Biol.* *in press* (2015).
2. Hamasaki, M., Matsumura, S., Satou, A., Takahashi, C., Oda, Y., Higashiura, C., Ishihama, Y., and Toyoshima, F. Pregnenolone functions in centriole cohesion during mitosis. *Chem. Biol.* 21, 1707-1721 (2014).

Fumiko Toyoshima: An emerging role of steroids in control of cell division. The 21th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Soul, Korea, 17-18 July, 2014.

Fumiko Toyoshima: Pregnenolone associates with mitotic spindles and functions in centriole cohesion. EMBO Conference Centrosome and Spindle pole bodies, Lisbon, Portugal, 30 September-3 October, 2014.

Fumiko Toyoshima: Molecular mechanisms for ECM-dependent oriented cell division, 第 37 回日本分子生物学会大会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日

岩野さやか、松村繁、佐藤綾香、若林昌樹、石濱泰、豊島文子：PCTK1 は PKA 制御サブユニット KAP0 と myosinX を介して細胞分裂軸を制御する、第 66 回日本細胞生物学会大会、奈良、2014 年 6 月 11-13 日

Shigeru Matsumura, Seiichi Uchida, Akatsuki Kimura, Tomoko Kojidani, Tokuko Haraguchi, Yuji Kamioka and Fumiko Toyoshima: Caveolin-1 guides an intrinsic code for spindle orientation to external cues, 第 37 回日本分子生物学会大会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日

池田愛、豊島文子：分化誘導条件下における ES 細胞の静止状態獲得機構の解析、第 37 回日本分子生物学会大会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日

Yukako Oda, Tetsuhisa Otani, Jyunichi Ikenouchi, Fumiko Toyoshima and Mikio Furuse: Tricellulin regulates junctional tension of epithelial cells at tricellular contacts via Cdc42, 第 37 回日本分子生物学会大会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日

石橋理基、上月智司、豊島文子：マウス ES 細胞の非対称分裂による中胚葉と内胚葉への運命決定機構の解析、第 37 回日本分子生物学会大会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日

福原充子、一條遼、豊島文子：妊娠・出産期の皮膚組織における H19 および miRNA-675 の機能解析、第 37 回日本分子生物学会大会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日

岩野さやか、佐藤綾香、松村繁、杉山直行、石濱泰、豊島文子：PCTK1 regulates integrin-dependent spindle orientation through PKA regulatory subunit KAP0 and myosin X, 第 37 回日本分子生物学会大会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日

森加奈恵、松村繁、豊島文子：keratin8 による細胞分裂軸制御機構の解明、第 37 回日本分子生物学会大会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日

一條遼、松村繁、本田哲也、豊島文子：妊娠による皮膚組織伸展負荷に応答した表皮基底細胞の適応機構の解析、第 37 回日本分子生物学会大会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日

米田早織、松村繁、一條遼、豊島文子：妊娠期における皮膚真皮から基底細胞への増殖シグナルの探究、第 37 回日本分子生物学会大会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日

教授	豊島文子
助教	松村繁 小田裕香子
大学院生	濱崎真弓、岩野さやか、石橋力、池田愛、一條遼、福原充子、森加奈恵、 米田早織、上月智司、小林大毅、小松崎友紀、東浦千夏

本年度は、小田裕香子さんが助教に着任し、生命科学研究科大学院生として上月智司、小林大毅、小松崎友紀、東浦千夏さんが新たに加わりました。濱崎真弓、岩野さやかさんが博士学位を取得、森加奈恵、米田早織さんが修士課程を卒業しました。秘書の孝橋奈美さんが退職しました。当分野では、「細胞の増殖と分化」をキーワードに、細胞分裂軸の方向を決めるメカニズムと組織構築、対称分裂と非対称分裂の振り分け機構、代謝と細胞分裂の関連について研究を進めています。本年に論文・学会で発表した研究成果のうち、2 課題を下記に記載します。

1) CDK ファミリー PCKT1 による細胞分裂軸制御機構の解明

細胞分裂軸を一定の方向に配置する現象は、様々なモデル生物の発生過程で見られ、組織構築や非対称分裂、器官形成などで重要な役割を果たしている。我々は、ヒト培養細胞の HeLa 細胞において、インテグリン依存的に紡錘体を基質に平行に配置して分裂軸を制御する新しい機構を発見し、更に、この系を利用してキナーゼ対するゲノムワイドな RNAi スクリーニングを行い、哺乳類における新規分裂軸制御因子の探索を行った。その結果、これまでに、Src ファミリーチロシンキナーゼである ABL1 を同定し、その作用機序と皮膚基底細胞での分裂軸方向の決定に貢献することを明らかにしてきた。本年は、スクリーニングによって新たに同定した PCKT1 の機能を解明した。

PCKT1 は CDK16 と呼ばれる CDK ファミリーに属するセリン/スレオニン キナーゼであり、高度に保存されたキナーゼドメインと、他の CDK と比べて長い N- 末端と C- 末端領域を有している。PCKT1 は小胞輸送や神経突起伸長、筋芽細胞の移動といった細胞周期非依存的な現象に関与することが報告されているが、細胞分裂軸に関する機能は報告されておらず、活性化機序、生理機能共に不明な点の多い分子である。我々はまず、HeLa 細胞において PCKT1 を siRNA でノックダウンすると、細胞外基質に対する分裂軸が異常になることを見出した。この分裂軸の異常は、siRNA 耐性の野生型 PCKT1 ではレスキューされるが、キナーゼ不能型 PCKT1 ではレスキューされなかったことから、PCKT1 はキナーゼ活性依存的に分裂軸を制御していることが分かった。次に、リン酸化プロ

テオーム解析と siRNA スクリーニングによって PCTK1 の基質を探索した結果、PCTK1 は PKA の調節サブユニットである KAP0 の Ser83 をリン酸化することで分裂軸を制御していることが分かった。また、Ser83 のリン酸化は、分裂期に上昇することを示した。さらに、Ser83 のリン酸化は KAP0 の二量体形成能や PKA 触媒サブユニットとの結合能に影響しなかったが、分裂軸制御因子の 1 つとして知られる myosin X との結合に必要であることを明らかにした。KAP0 は myosin X の FERM ドメインと結合し、myosin X-FERM と $\beta 1$ integrin との結合を促進した。さらに、この myosin X-FERM と $\beta 1$ integrin の結合が分裂軸の制御に必須であることを示した。以上より PCTK1-KAP0-myosin X- $\beta 1$ integrin が機能的モジュールとして細胞外基質とアクチン細胞骨格を結びつけ、細胞外基質依存的に分裂軸を制御していることが分かった。本研究は、Mol. Cell. Biol. に発表した（岩野）。

2) コレステロール代謝産物プレグネノロンによる中心体制御機構の解明

細胞分裂の制御におけるタンパク質の機能については、これまで多くの検証がなされてきたが、脂質や代謝物質の機能についてはほとんど不明である。本研究では、コレステロール代謝物質の Pregnenolone (P5) が分裂期の中心小体接着を制御することを見出した。P5 は、チトクロム P450 ファミリーの Cyp11a1 により産生されるコレステロール代謝産物であり、すべてのステロイドホルモンの前駆体である。申請者は、HeLa 細胞において、細胞周期の進行に伴い P5 の細胞内濃度が分裂期をピークに変動することを発見した。また、P5 は分裂期の紡錘体極に集積することを見出した。次に、RNA 干渉法により Cyp11a1 をノックダウンし細胞内の P5 を枯渇させると、紡錘体の多極化が誘導されることを示した。Cyp11a1 ノックダウン細胞におけるこの異常は、P5 の添加により抑えられるが、P5 の下流の代謝産物であるプロゲステロンや 17-OH-P5 では抑制されないことから、P5 が紡錘体極の安定化に貢献することを示した。さらに、この紡錘体の多極化は中心体複製の異常ではなく、本来分裂後期で起こる中心小体のかい離が、分裂前期や分裂中期の早い段階で起こることが原因であることを明らかにした。中心小体は、S 期で複製された後、コヒーシンなどの接着タンパク質により繋ぎ止められている。分裂期に入ると、分裂前期で Plk1 が接着タンパク質をリン酸化することで一部の接着タンパク質は中心小体から外れるが、一部は、short-shugoshin1 (sSgo1) が接着タンパク質を Plk1 から保護することによって残っているため、中心小体の接着は維持されている。本論文では、P5 が sSgo1 の N 末端のコイルドコイル領域に直接結合し、sSgo1 を紡錘体極に局在化させることで、分裂期における中心小体の接着維持を促進する機能を持つことを明らかにした。本研究は、Chem. Biol. に発表した（濱崎）。

Laboratory of Growth Regulation

Members

Professor	Ryoichiro Kageyama
Associate Professor	Toshiyuki Ohtsuka
Assistant Professor	Taeko Kobayashi
Hakubi Associate Professor	Itaru Imayoshi
Hakubi Assistant Professor	Tomoko Tateya
iCeMS Assistant Professor	Hiromi Shimojo
Research Fellow	Akihiro Isomura
	Yukiko Harima
	Takahiko Matsuda
Graduate Student	Naoki Watanabe, Mitsushige Ando, Kumiko Kobayashi, Shama Ratiram Bansod, Susumu Sakamoto, Yuki Maeda, Anna Araki, Chihiro Masumoto, Kohei Jino, Marina Matsumiya, Yuhei Yasueda, Talita Glaser

Introduction

The research interest of this laboratory is to understand the molecular mechanism of cell differentiation and organogenesis. Particularly, we are interested in basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors that regulate various developmental processes including neural development and somite formation. We are characterizing the functions of bHLH genes by misexpressing the genes with virus vectors and electroporation (gain-of-function study) and by generating knock-out mice (loss-of-function study). We previously showed that bHLH proneural genes such as *Ascl1* (also called *Mash1*) and *Math3* promote neuronal versus glial fate determination, whereas the bHLH repressor genes *Hes1* and *Hes5* regulate maintenance of neural stem cells by repressing proneural gene expression. These results indicate that the balance between bHLH proneural and bHLH repressor genes is important for a choice favoring neuronal differentiation or neural stem cell proliferation. It was recently shown however that the proneural gene *Ascl1* not only promotes neuronal fate determination but also induces proliferation of neural stem cells. In addition, it was found that the bHLH gene *Olig2* regulates both oligodendrocyte fate determination and neural stem cell proliferation. Our group found that *Hes1* promotes astrocyte formation as well as neural stem cell proliferation. Thus, each bHLH fate determination factor has opposing functions, neural stem cell proliferation and specific cell fate determination, but the detailed mechanism of how these bHLH factors regulate such opposing functions is

unknown.

We found that in neural stem cells, Hes1 expression oscillates by negative feedback with a period of about 2-3 hours. Hes1 oscillations drive cyclic expression of the proneural genes *Ascl1* and *Neurog2* and the Notch ligand gene *Deltalike1* (*Dll1*). In contrast, the expression of *Ascl1*, *Neurog2* and *Dll1* is sustained (non-oscillatory) in postmitotic differentiating neurons. We also found that although Hes1 expression oscillates in neural stem cells, it becomes up-regulated and sustained during astrocyte formation. Similarly, the bHLH factor Olig2 expression oscillates in neural stem cells but becomes up-regulated and sustained during oligodendrocyte formation. Our results therefore suggest that the multipotency is a state of oscillatory expression of multiple fate determination factors, while the fate determination is a process of dominant expression of a selected single bHLH factor, which represses the other fate determination factors. We further showed by a new optogenetics approach that sustained expression of the proneural gene *Ascl1* induces neuronal fate determination, whereas oscillatory expression of *Ascl1* activates proliferation of neural stem cells. Thus, the expression dynamics are very important for a choice between neural stem cell proliferation and specific cell fate determination.

Topics

1) bHLH factors in self-renewal, multipotency, and fate choice of neural progenitor cells: I. IMAYOSHI and R. KAGEYAMA

Multipotent neural progenitor cells (NPCs) undergo self-renewal while producing neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. These processes are controlled by multiple basic helix-loop-helix (bHLH) fate determination factors, which exhibit different functions by post-translational modifications. Furthermore, depending on the expression dynamics, each bHLH factor seems to have two contradictory functions, promoting NPC proliferation and cell cycle exit for differentiation. The oscillatory expression of multiple bHLH factors correlates with the multipotent and proliferative state, whereas sustained expression of a selected single bHLH factor regulates the fate determination. bHLH factors also regulate direct reprogramming of adult somatic cells into neurons and oligodendrocytes. Thus, bHLH factors play key roles in development and regeneration of the nervous system.

2) Ultradian oscillations and pulses: coordinating cellular responses and cell fate decisions: A. ISOMURA and R. KAGEYAMA

Biological clocks play key roles in organismal development, homeostasis and function. In recent years, much work has focused on circadian clocks but emerging studies have highlighted the existence of ultradian oscillators – those with the periodicity of much less than 24 hours. Accumulating evidence, together with

recently developed optogenetic approaches, suggests that such ultradian oscillators play important roles during cell fate decisions, and analysis on the functional links between ultradian oscillation and cell fate determination will contribute to a deeper understanding of the design principle of developing embryos. We found the mechanisms of ultradian oscillatory dynamics and introduce examples of ultradian oscillators in various biological contexts. We also demonstrated how optogenetic technology has been used to elucidate the biological significance of ultradian oscillations.

3) Oscillatory control of bHLH factors in neural progenitors: I. IMAYOSHI and R. KAGEYAMA

The mammalian brain consists of a complex ensemble of neurons and glia. Their production during development and remodeling is tightly controlled by various regulatory mechanisms in neural progenitor cells (NPCs). Amongst such regulations, basic helix-loop-helix (bHLH) factors have key functions in the self-renewal, multipotency, and fate determination of NPCs. Here, we highlight the importance of the expression dynamics of bHLH factors in these processes. The oscillatory expression of multiple bHLH factors is correlated with the multipotent and self-renewable state, whereas sustained expression of a selected bHLH factor regulates fate determination. We also found potential mechanisms by which a single bHLH factor can exhibit versatile functions in NPC regulation as well as the hierarchical structure of the bHLH factor oscillatory network.

4) Continuous postnatal neurogenesis contributes to formation of the olfactory bulb neural circuits and flexible olfactory associative learning: M. SAKAMOTO, N. IEKI, G. MIYOSHI, D. MOCHIMARU, H. MIYACHI, T. IMURA, M. YAMAGUCHI, G. FISHELL, K. MORI, R. KAGEYAMA and I. IMAYOSHI

The olfactory bulb (OB) is one of the two major loci in the mammalian brain where newborn neurons are constantly integrated into the neural circuit during postnatal life. Newborn neurons are generated from neural stem cells in the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricle and migrate to the OB through the rostral migratory stream. The majority of these newborn neurons differentiate into inhibitory interneurons, such as granule cells and periglomerular cells. It has been reported that prolonged supply of newborn neurons leads to continuous addition/turnover of the interneuronal populations and contributes to functional integrity of the OB circuit. However, it is not still clear how and to what extent postnatal-born neurons contribute to OB neural circuit formation, and the functional role of postnatal neurogenesis in odor-related behaviors remains elusive. To address this question, here by using genetic strategies, we first determined the unique integration mode of newly born interneurons during postnatal development of the mouse OB. We then manipulated these interneuron populations and found that continuous postnatal neurogenesis in the SVZ-OB plays pivotal roles in flexible olfactory associative learning and memory.

List of Publications

- Imayoshi, I. and Kageyama, R. (2014) Oscillatory control of bHLH factors in neural progenitors. **Trends Neurosci.** 37, 531-538.
- Kobayashi, T., and Kageyama, R. (2014) Expression dynamics and functions of Hes factors in development and diseases. **Curr. Top. Dev. Biol.** 110, 263-283.
- Harima, Y., Imayoshi, I., Shimojo, H., Kobayashi, T., and Kageyama, R. (2014) The roles and mechanism of ultradian oscillatory expression of the mouse Hes genes. **Semin. Cell Dev. Biol.** 34C, 85-90.
- Isomura, A., and Kageyama, R. (2014) Ultradian oscillators: rhythms and cell fate decisions. **Development** 141, 3627-3636.
- Shimojo, H., Harima, Y., and Kageyama, R. (2014) Visualization of Notch signaling oscillation in cells and tissues. **Methods Mol Biol.** 1187, 169-179.
- Imayoshi, I., and Kageyama, R. (2014) bHLH factors in self-renewal, multipotency, and fate choice of neural progenitor cells. **Neuron** 82, 9-23.
- Sakamoto, M., Kageyama, R., and Imayoshi, I. (2014) The functional significance of newly born neurons integrated into olfactory bulb circuits. **Front. Neurosci.** 8, 121.
- Sakamoto, M., Ieki, N., Miyoshi, G., Mochimaru, D., Miyachi, H., Imura, T., Yamaguchi, M., Fishell, G., Mori, K., Kageyama, R., and Imayoshi, I. (2014) Continuous postnatal neurogenesis contributes to formation of the olfactory bulb neural circuits and flexible olfactory associative learning. **J. Neurosci.** 34, 5788-5799.
- Hatakeyama, J., Wakamatsu, Y., Nagafuchi, A., Kageyama, R., Shigemoto, R., and Shimamura, K. (2014) Cadherin-based adhesions in the apical endfoot are required for active Notch signaling to control neurogenesis in vertebrates. **Development** 141, 1671-1682.
- Mochizuki, Y., Iida, A., Lyons, E., Kageyama, R., Nakauchi, H., Murakami, A., Watanabe, S. (2014) Use of cell type-specific transcriptome to identify genes specifically involved in Müller glia differentiation during retinal development. **Dev. Neurobiol.** 74, 426-437.
-

Kageyama, R.: The significance of dynamic control of fate determination factors in proliferation of neural stem cells, Adult Neurogenesis, Mumbai, India, 6-8 February, 2014.

Kageyama, R.: The significance of oscillatory expression of Notch effectors in neural development. Gordon Research Conference “Notch Signaling in Development, Regeneration & Disease” , Lewiston, USA, 20-25 July, 2014.

Kageyama, R.: Dynamic control of bHLH genes in multipotency and fate choice of neural progenitors. Gordon Research Conference “Neural Development” , Newport, USA, 10-15 August, 2014.

Kageyama, R.: Dynamic control of Notch signaling in multipotency and fate choice of neural stem cells. Notch Meeting VIII, Athens, Greece, 28 September- 1 October, 2014.

Kageyama, R.: Dynamic control of bHLH genes in multipotency and fate choice of neural stem cells. DiSCUSS-CSC, Hanover, Germany, 15-17 October, 2014.

Kageyama, R.: Dynamic control of bHLH factors in multipotency and fate choice of neural stem cells. 18th International Conference of ISD in conjunction with BSDB, London, UK, 2-5 November, 2014.

Tateya, T., Imayoshi, I., Matsuda, T., Tateya, I., and Kageyama, R.: In Vivo Overactivation of Notch Signaling Pathway in Developing Cochlear Epithelium. The Association for Research in Otolaryngology 37rd MidWinter Meeting, San Diego USA, 21-25 February, 2014.

Kobayashi, T.: Deubiquitination modulates Hes1 repressor activity by Hes1 protein stabilization. The 5th International Congress on Stem Cells and Tissue Formation, Dresden, Germany, 8-11 July, 2014.

Kageyama, R.: Oscillatory gene expression in somitogenesis and neurogenesis. IIAS Research Conference 2014 “Chromatin Decoding” , 木津川 , 2014 年 5 月 12-15 日

Kageyama, R.: Light control of Ascl1/Mash1 expression in neural stem cells. iCeMS International Symposium “Light Control in Cell Biology” , 京都 , 2014 年 6 月 12-13 日

Sakamoto, S., Tateya, T., Harima, Y., Imayoshi, I., Ito, J., and Kageyama, R.: Expression of bHLH genes in developing cochlear epithelium. Inner ear biology workshop, 京都 , 2014 年 11 月 1-4 日

Tateya, T., Sakamoto, S., Imayoshi, I., and Kageyama, R.: In Vivo Overactivation of Notch Signaling Pathway in Cochlear Prosensory Epithelium. Inner ear biology workshop, 京都 , 2014 年 11 月 1-4 日

影山龍一郎：遺伝子発現振動の分子機構と意義、第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference II、神戸、2014 年 9 月 5-6 日

影山龍一郎：Dynamic control of bHLH factors in multipotency and fate choice of neural stem cells、第 37 回日本神経科学大会、横浜、2014 年 9 月 11-13 日

小林妙子：Hes1 の脱ユビキチン化酵素は Hes1 タンパク質の安定性と機能を制御する、第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月 15-18 日

下條博美、磯村彰宏、大塚俊之、宮地均、影山龍一郎：マウス発生過程における Notch リガンド Dll1 の発現ダイナミクスの意義、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日

渡邊直希、大塚俊之、影山龍一郎：大脳皮質形成期において Hbp1 は細胞周期進行の制御を介してニューロン分化のタイミングを制御する、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日

教授	影山龍一郎
准教授	大塚俊之
助教	小林妙子
白眉准教授	今吉格
白眉助教	楯谷智子
iCeMS 助教	下條博美
研究員	磯村彰宏
	播磨有希子
	松田孝彦
大学院生	渡邊直希、安藤充重、Shama Ratiram Bansod、小林久美子、坂本進、 前田勇樹、荒木杏菜、増本千尋、神尾航平、松宮舞奈、安枝侑平、 Talita Glaser

当研究室には、平成 26 年 4 月から医学研究科博士課程 1 年の坂本進、生命科学研究科修士課程 1 年の神尾航平、松宮舞奈、安枝侑平、研究生の貝瀬峻が新たに加わった。その後、阪上紀代、馬杉美和子が iCeMS の職員としてグループに加わった。一方、日本学術振興会特別研究員の平島剛志は、再生医科学研究所に特定助教として赴任した。また、特別研究学生の東京大学理学研究科博士課程の川口喬吾およびサンパウロ大学の Talita Glaser は、共同研究を無事終了した。

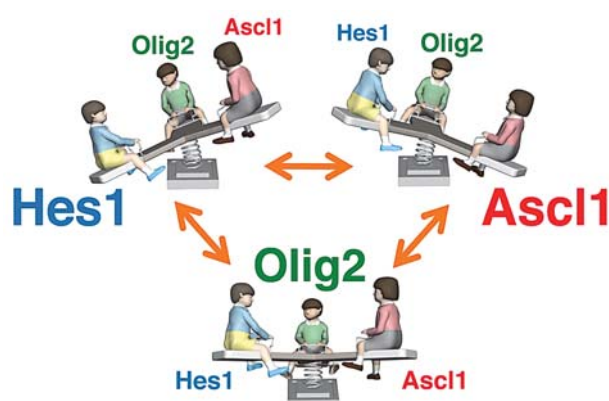
影山は、2 月にインドでの国際会議、7 月および 8 月に米国でのゴードン会議、9 月にギリシャ、10 月にドイツ、11 月に英国での国際シンポジウムで招待講演を行った。インドの国際会議には、大学院生の Shama Bansod も参加した。その他、教室員の多くが、分子生物学会年会（神戸）等の学会で発表した。

当研究室のテーマは、哺乳動物の発生・分化の分子機構を明らかにするというもので、塩基性領域-ヘリックス・ループ・ヘリックス因子（bHLH 因子）に注目して解析を行っている。本年は、以下に記すように、神経分化制御機構に関する研究が進展した。

(1) 神経幹細胞における多分化能と運命を決定する因子の発現振動による制御

神経幹細胞は自己複製を行い、かつ脳を構成する主要な 3 種類の細胞、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを生み出す多分化能を持つ。bHLH 因子 *Ascl1*, *Hes1*, *Olig2* はそれぞれ

ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの運命決定を行うが、神経幹細胞の自己複製も活性化する。しかし、これらの bHLH 因子がどのようにして神経幹細胞の自己複製と運命決定という全く異なる現象を制御するのかは不明であった。イメージング解析から、神経幹細胞において Hes1、Ascl1 タンパク質は 2 ～ 3 時間周期で、Olig2 タンパク質は 5 ～ 8 時間周期で発現振動していること、運命決定時にはそれぞれの分化決定因子の発現が持続上昇することがわかった。光遺伝学的解析から、Ascl1 の発現が持続するとニューロンに分化するが、振動すると神経幹細胞の増殖能が活性化されることが示された。したがって、神経幹細胞の多分化能とは、異なる分化決定因子がシーソーのように発現を増減させつつお互いに拮抗し合っている状態で（下図）、運命決定とは選ばれた分化決定因子が持続発現する状態であると結論付けられた。（今吉格）



(2) 継続的な生後ニューロン新生は嗅球の神経回路形成と柔軟な嗅覚連合学習に寄与する

マウスの嗅球は、生後においても新生ニューロンが継続的に神経回路に組み込まれている主要な領域のひとつである。新生ニューロンは側脳室周囲の脳室下帯の神経幹細胞から産生され、吻側移動経路を通して、嗅球へと移動する。新生ニューロンのほとんどは、顆粒細胞や傍糸球体細胞といった抑制性の介在ニューロンへと分化する。これまでの研究から、新生ニューロンの長期的な供給は、介在ニューロン集団の追加と代謝回転を誘導し、嗅球神経回路の機能的完全性に貢献する事が報告されている。しかしながら、生後に産生されるニューロンが嗅球の神経回路形成に寄与する様式や程度、さらに生後のニューロン新生が嗅覚関連行動に果たす役割については、明らかになっていない。この問題を解決するために、我々は遺伝学的手法を使うことで、マウスの生後嗅球の発生過程における新生ニューロンの介入様式を明らかにした。我々は、さらにこれらの介在ニューロンを機能操作し、脳室下帯と嗅球で起きている生後ニューロン新生は、柔軟な嗅覚連合学習・記憶にとって必須の役割を担っていることを発見した。（坂本雅行）



2014 年 4 月撮影

Members

Associate Professor

Takayuki Miyazawa

Introduction

Our research objective is to understand the pathogenesis of animal retroviruses, functions of endogenous retroviruses and potential iatrogenic risks by infection of endogenous retroviruses in xenotransplantation, vaccination and regenerative medicine. We are currently studying simian retroviruses, feline endogenous retroviruses, bovine endogenous retroviruses and koala retroviruses.

Topics

1) Dysfunction of bovine endogenous retrovirus K2 envelope glycoprotein is related to unsuccessful intracellular trafficking : Y. NAKAYA and T. MIYAZAWA

Endogenous retroviruses (ERVs) are the remnants of retroviral infection of ancestral germ cells. Mutations introduced into ERVs halt the production of infectious agents, but their effects on the function of retroviral proteins are not fully understood. Retroviral envelope glycoproteins (Envs) are utilized in membrane fusion during viral entry, and we recently identified intact coding sequences for bovine endogenous retrovirus K1 (BERV-K1) and BERV-K2 Envs. Amino acid sequences of BERV-K1 Env (also called Fematrin-1) and BERV-K2 Env are similar, and both viruses are classified in the genus Betaretrovirus. While Fematrin-1 plays an important role in cell-to-cell fusion in bovine placenta, the BERV-K2 envelope gene is marginally expressed in vivo, and its recombinant Env protein is defective in membrane fusion due to inefficient cleavage of surface (SU) and transmembrane subunits. Here, we conducted chimeric analyses of Fematrin-1 and BERV-K2 Envs and revealed that defective maturation of BERV-K2 Env contributed to failed intracellular trafficking. Fluorescence microscopy and flow cytometric analysis suggested that in contrast to Fematrin-1 Env, BERV-K2 Env could not be transported from the endoplasmic reticulum to the trans-Golgi network, where cellular proteases required for processing retroviral Envs are localized. We also identified that one of the responsive regions of this phenomenon resided within a 65-amino-acid region of BERV-K2 SU. This is the first report to identify that retroviral Env SU is involved in the regulation of intracellular trafficking, and it may help to elucidate the maturation process of Fematrin-1 and other related Envs.

2) Genetic diversity of feline morbilliviruses isolated in Japan. : S. SAKAGUCHI, S. NAKAGAWA, R. YOSHIKAWA¹, C. KUWAHARA, H. HAGIWARA, K. ASAI, K. KAWAKAMI, Y. YAMAMOTO, M. OGAWA and T. MIYAZAWA

Feline morbillivirus (FmoPV) is an emerging virus in domestic cats and considered to be associated with tubulointerstitial nephritis. Although FmoPV was first described in China in 2012, there has been no report of the isolation of this virus in other countries. In this report, we describe the isolation and characterization of FmoPV from domestic cats in Japan. By using reverse transcription (RT)-PCR, we found that three of 13 urine samples from cats brought to veterinary hospitals were positive for FmoPV. FmoPV strains SS1 to SS3 were isolated from the RT-PCR-positive urine samples. Crandell-Rees feline kidney (CRFK) cells exposed to FmoPV showed cytopathic effects with syncytia formation, and FmoPV N protein was detected by indirect immunofluorescence assays. In addition, pleomorphic virus particles with apparent glycoprotein envelope spikes were observed by electron microscopy. By sequence analysis of FmoPV H and L genes, we found that FmoPVs showed genetic diversity; however, signatures of positive selection were not identified.

3) A soluble envelope protein of endogenous retrovirus (FeLIX) present in serum of domestic cats mediates infection of a pathogenic variant of feline leukemia virus : S. SAKAGUCHI, T. SHOJIMA, D. FUKUI and T. MIYAZAWA

T-lymphotropic feline leukemia virus (FeLV-T), a highly pathogenic variant of FeLV, induces severe immunosuppression in cats. FeLV-T is fusion-defective because in its PHQ motif, a gammaretroviral consensus motif in the N-terminal of an envelope protein, histidine is replaced with aspartate. Infection by FeLV-T requires FeLIX, a truncated envelope protein encoded by an endogenous FeLV, for transactivation of infectivity and Pit1 for binding FeLIX. Although Pit1 is present in most tissues in cats, the expression of FeLIX is limited to certain cells in lymphoid organs. Therefore, the host cell range of FeLV-T was thought to be restricted to cells expressing FeLIX. However, because FeLIX is a soluble factor and expressed constitutively in lymphoid organs, we presumed it to be present in blood and evaluated its activities in sera of various mammalian species using a pseudotype assay. We demonstrated that cat serum has FeLIX activity at a functional level, suggesting that FeLIX is present in cats and FeLV-T may be able to infect cells expressing Pit1 regardless of the expression of FeLIX *in vivo*. In addition, FeLIX activities in sera were detected only in domestic cats but not in other feline species tested. To our knowledge, this is the first report to prove that a large amount of truncated envelope protein of endogenous retrovirus is circulating in the blood to facilitate the infection of a pathogenic exogenous retrovirus.

4) Construction of an infectious clone of simian foamy virus of Japanese macaque (SFVjm) and phylogenetic analyses of SFVjm isolates : R. YOSHIKAWA, S. NAKAGAWA, M. OKAMOTO and T. MIYAZAWA

Foamy viruses belong to the genus *Spumavirus* of the family *Retroviridae* and have been isolated from many mammalian species. It was reported that simian foamy viruses (SFVs) have co-evolved with host species. In this study, we isolated four strains (WK1, WK2, AR1 and AR2) of SFV (named SFVjm) from Japanese macaques (*Macaca fuscata*) in main island Honshu of Japan. We constructed an infectious molecular clone of SFVjm strain WK1, termed pJM356. The virus derived from the clone replicated and induced syncytia in human (human embryonic kidney 293T cells), African green monkey (Vero cells) and mouse cell lines (Mus dunni tail fibroblast cells). Phylogenetic analysis also revealed that these four SFVjm strains formed two distinct SFVjm clusters. SFVjm strains WK1 and WK2 and SFV isolated from Taiwanese macaques (*Macaca cyclopis*) formed one cluster, whereas strains AR1 and AR2 formed the other cluster with SFV isolated from a rhesus macaque (*Macaca mulatta*).

5) Suppression of production of baboon endogenous virus by dominant negative mutants of cellular factors involved in multivesicular body sorting pathway : R. YOSHIKAWA, R. N. MIYAHARA, A. HASHIMOTO, M. ABE, J. YASUDA and T. MIYAZAWA

Baboon endogenous virus (BaEV) is an infectious endogenous gammaretrovirus isolated from a baboon placenta. BaEV-related sequences have been identified in both Old World monkeys and African apes, but not in humans or Asian apes. Recently, it was reported that BaEV-like particles were produced from Vero cells derived from African green monkeys by chemical induction, and thus BaEV-like particles may contaminate biological products manufactured using Vero cells. In this study, we constructed an infectious molecular clone of BaEV strain M7. We found two putative L-domain motifs, PPPY and PSAP, in the pp15 region of Gag. To examine the function of the L-domain motifs, we conducted virus budding assay using L-domain motif mutants. We revealed that the PPPY motif, but not the PSAP motif, plays a major role as the L-domain in BaEV budding. We also demonstrated that Vps4A/B are involved in BaEV budding. These data suggest that BaEV Gag recruits the cellular endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery through the interaction of the PPPY L-domain with cellular factors. These data will be useful for controlling contamination of BaEV-like particles in biological products in the future.

List of Publications

Yoshikawa, R., Takeuchi, J. S., Yamada, E., Nakano, Y., Ren, F., Tanaka, H., Münk, C., Harris, R. S., Takayuki, M., Koyanagi, Y., Sato, K. (2014). Vif determines the requirement for CBF- β in APOBEC3

degradation. *J. Gen. Virol.* (Epub ahead of print)

Yoshikawa, R., Miyaho, R., Hashimoto, A., Abe, M., Yasuda, J., and Miyazawa, T.* (2014). Suppression of production of baboon endogenous virus by dominant negative mutants of cellular factors involved in multivesicular body sorting pathway. *Virus Res.* (Epub ahead of print)

Sakaguchi, S., Shojima, T., Fukui, D., and Miyazawa, T.* (2014). A soluble envelope protein of endogenous retrovirus (FeLIX) present in serum of domestic cats mediates infection of a pathogenic variant of feline leukemia virus. *J. Gen. Virol.* (Epub ahead of print)

Yoshikawa, R., Nakagawa, S.*, Okamoto, M., and Miyazawa, T.* (2014). Construction of an infectious molecular clone of simian foamy virus of Japanese macaque (SFVjm) and phylogenetic analyses of SFVjm isolates. *Gene* 548, 149-154.

Sakaguchi, S., Nakagawa, S., Yoshikawa, R., Kuwahara, C., Hagiwara, H., Asai, K., Kawakami, K., Yamamoto, Y., Ogawa, M., and Miyazawa, T.* (2014). Genetic diversity of feline morbilliviruses isolated in Japan. *J. Gen. Virol.* 95, 1464-1468.

Nakaya, Y.* and Miyazawa, T.* (2014). Dysfunction of bovine endogenous retrovirus K2 envelope glycoprotein is related to unsuccessful intracellular trafficking. *J. Virol.* 88, 6896-6905.

Shimode, S., Nakagawa, S., Yoshikawa, R., Shojima, T., and Miyazawa, T.* (2014). Heterogeneity of koala retrovirus isolates. *FEBS Lett.* 588, 41-46.

Yoshikawa, R., Shimode, S., Sakaguchi, S., and Miyazawa, T.* (2014). Contamination of live attenuated vaccines with an infectious feline endogenous retrovirus (RD-114 virus). *Arch. Virol.* 159, 399-404.

Miyazawa, T.* (2014). Molecular characterization of koala retroviruses isolated from koalas (*Phascolarctos cinereus*) reared in Japanese zoos. In *The koala and its retroviruses: implications for sustainability and survival*. edited by G. W. Pye, R. N. Johnson, A. D. Greenwood. Australian Museum.

宮沢孝幸*,坂口翔一 2014. ネコモルビリウイルスの発見ーウイルス性腎不全の可能性ー *NJK* 14(8), 7-11.

坂口翔一、中川草、小川誠、宮沢孝幸 * 2014. 猫の慢性腎臓病 Part 2 : 尿細管間質性腎炎と関連するネコモルビリウイルス *J-Vet* 27(8), 74-79.

宮沢孝幸 * 2014. 生ワクチン中に混入する感染性のレトロウイルスについて 日生研たより 60, 49-54.

Yoshikawa, R., Okamoto, M., Sakaguchi, S., Nakagawa, S., Miura, T., Hirai, H., and Miyazawa, T. : Simian retrovirus 4 induces lethal acute thrombocytopenia in Japanese macaques. Kyoto University and Bogor Agricultural University International Symposium (Diversity and Conservation of Asian Primates), Bogor, Indonesia, 17-21 August, 2014.

Yoshikawa, R., Okamoto, M., Sakaguchi, S., Nakagawa, S., Miura, T., Hirai, H., and Miyazawa, T. : Simian retrovirus 4 induces lethal acute thrombocytopenia in Japanese macaques and possible involvement of endogenous retroviruses in pathogenesis. Workshop on Endogenous Retroviruses, Syria, Virginia, U.S.A. 7-10 August, 2014.

Nakagawa, S., Miyazawa, T., Gojobori, T., and Imakawa, K. : Transcriptome analysis of ERV-derived genes in bovine conceptuses during the period of placentation. Workshop on Endogenous Retroviruses, Syria, Virginia, U.S.A. 7-10 August, 2014.

Sakaguchi, S., Nakagawa, S., and Miyazawa, T. : Serological survey and characterization of feline morbillivirus in Japan, International Feline Retrovirus Research Symposium & International Society for Companion Animal Infectious Disease, Naiagara-On-The-Lake, Ontario, Canada, 19-22 October, 2014.

Shimode, S., Nakagawa, S., and Miyazawa, T. : Retroviruses and cat' s evolution, International Feline Retrovirus Research Symposium & International Society for Companion Animal Infectious Disease, Naiagara-On-The-Lake, Ontario, Canada, 19-22 October, 2014.

宮沢孝幸 : 古代ウイルス学への招待、SSH サイエンスカフェ、刈谷、2014 年 1 月 11 日

宮沢孝幸 : 内在性レトロウイルスの医原性感染の可能性、日生研第二研究会、青梅、2014 年 2 月 7 日

宮沢孝幸 : 伴侶動物用ワクチンに含まれるレトロウイルスについて、日本獣医内科学アカデミー第 10 回記念学術大会、横浜、2014 年 2 月 7-9 日

宮沢孝幸 : レトロウイルスと哺乳類の進化、天高アカデメイア、大阪、2014 年 5 月 30 日

宮沢孝幸：内在性レトロウイルスと哺乳類の進化、東海医学会貢献会、伊勢原、2014年8月4日

宮沢孝幸：胎盤と胚発生における内在性レトロウイルスの役割 第16回日本進化学会、高槻、8月21-24日

宮沢発表：哺乳動物の胎盤の進化とレトロウイルス、第22回日本胎盤学会学術集会、第32回日本絨毛性疾患研究会、京都、2014年10月3-4日

宮沢孝幸：レトロウイルスの生態、宮崎大学人獣共通感染症教育・研究プロジェクト公開セミナー、宮崎、2014年10月16日

宮沢孝幸：哺乳類の進化とレトロウイルス、日本動物遺伝育種学会第15回大会、和光、2014年10月30日-11月1日

宮沢孝幸、仲屋友喜：Endogenization of betaretroviruses which are involved in placentation.、第37回日本分子生物学会、横浜、2014年11月25-27日

宮沢孝幸：ブタ内在性レトロウイルス（PERV）のリスク、第41回日本臓器保存生物医学会学術集会、豊中、2014年11月28-29日

宮沢孝幸：内在性レトロウイルスの機能と哺乳類の進化、琉球大学医学部大学院セミナー、那覇、2014年12月12日

宮穂里江：コアラレトロウイルス（KoRV）の病原性解析、第17回日本レトロウイルス研究会、熱海、2014年7月3-5日

橋本 暁：Safety of iPS cells: possible contamination of replication-competent endogenous gammaretroviruses in mouse feeder layer cells.、第17回日本レトロウイルス研究会、熱海、2014年7月3-5日

宮沢孝幸：内在性レトロウイルスと哺乳類の発生と進化、第17回日本レトロウイルス研究会、熱海、2014年7月3-5日

小出りえ、坂口翔一、宮沢孝幸：ネコモルビリウイルスの最適なウイルス分離法の検討、第157回日本獣医学会学術集会、札幌、2014年9月9-12日

坂口翔一、中川 草、吉川禄助、山本 祐、小川誠、宮沢孝幸：日本国内におけるネコモルビリウイルスの分離と抗体調査、第157回日本獣医学会学術集会、札幌、2014年9月9-12日

牧野晶子、宮沢孝幸、鈴木善幸、三浦恭子、朝長啓造：ハダカデバネズミのゲノムに内在化したレトロウイルス様配列の解析、第 157 回日本獣医学会学術集会、札幌、2014 年 9 月 9-12 日

佐藤英次、兼子明久、齋藤 暁、山中淳史、鈴木樹理、渡邊朗野、吉田友教、吉川禄助、宮沢孝幸、明里宏文、岡本宗裕：サルレトロウイルス 4 型プロウイルス陽性非発症ニホンザルの解析、第 157 回日本獣医学会学術集会、札幌、2014 年 9 月 9-12 日

宮沢孝幸：哺乳類の胎盤の進化と内在性レトロウイルス、鹿児島大学共同獣医学部附属動物病院特別セミナー、鹿児島、2014 年 10 月 17 日

吉川禄助、竹内（柴田）潤子、山田英里、中野雄介、木村雄一、橋本 暁、宮沢孝幸、佐藤佳、小柳義夫：FIV サブタイプ間における Vif タンパク質の機能的相違性、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

宮沢孝幸、坂口翔一、小川誠：ネコに持続感染するネコモルビリウイルスは腎不全を起こすのか？、第 35 回動物臨床医学会記念年次大会、大阪、2014 年 11 月 14-16 日

下出紗弓、中川 草、宮沢孝幸：ネコの進化過程における内在性レトロウイルスの獲得、第 37 回日本分子生物学会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日

准教授

宮沢孝幸

2014 年は、日本学術振興会のポスドクとして Magda Matousova さん、医学研究科大学院博士課程の下出紗弓さん、坂口翔一君、研究生の宮穂（中岡）里江さん、技術補佐員の正玄裕子さん、そして私の総勢 6 名でスタートした。2 月には、医科学研究科大学院修士課程 1 年の橋本 暁君が研究室メンバーに加わった。4 月には、小出りえさんが医科学研究科大学院修士課程に入学し、研究室メンバーに加わった。同じく 4 月には宮穂（中岡）里江さんが人間・環境学研究科大学院博士課程に入学した。シンシナチ大学に留学していた寺川純平君（日本学術振興会特別研究員 [PD]）は、8 月末に特別研究員を辞退し、オハイオ州立大学に異動した。同じく 8 月末には、ポスドクの Magda Matousova さんがチェコに帰国した。昨年から引き続き宮沢は、附属感染症モデル研究センター（進化ウイルス研究領域）の准教授を兼任している。

当研究分野は、動物由来の病原性レトロウイルスと内在性レトロウイルスの研究をメインに行っている。内在性レトロウイルスは太古の昔に流行していたレトロウイルスが生殖細胞に感染し、組み込まれたものである。すべての細胞（体細胞と生殖細胞）にレトロウイルス由来の配列は含まれているが、ほ乳類のゲノムは、およそ 10% が内在性レトロウイルスの配列で占められている。

病原性レトロウイルスを対象とした研究では、ニホンザルで血小板減少症を引き起こすサルレトロウイルス、コアラで白血病や免疫不全を引き起こすコアラレトロウイルスの研究を行っている。コアラレトロウイルスは内在化しつつある極めて珍しいレトロウイルスであり、レトロウイルスの内在化機構を解明するモデルとしても期待されている。

感染性の内在性レトロウイルスは、異種移植や再生医療の際に問題となるばかりではなく、異種の動物由来細胞を用いて製造される生物学的製剤（ワクチンなど）にも迷入する可能性がある。また、内在性レトロウイルス由来の RNA は、市販の逆転写酵素にも混入しており、メタゲノム解析やレトロウイルス感染症を研究する際の障害となっている。内在性レトロウイルスは潜在的な危険性を有しているが、その一方で宿主によって有利に働いている場合もある。内在性レトロウイルスが病原性レトロウイルスの感染防御に働いている例は古くから知られていたが、最近、ほ乳類の発生段階に内在性レトロウイルスが重要な役割を担うことがわかりつつある。我々は、ウシや霊長類において、内在性レトロウイルスが胎盤においてどのように関わっているかどうかを調べている。

我々の 2014 年の主な研究テーマは以下の通りである。1) 霊長類研究所で発生したニホンザル血小板減少症の病因解明、2) 霊長類由来内在性レトロウイルスの進化的意義、3) 霊長類由来フォー

ミーウイルスによる群移動歴の解析、4) ウシ胎盤形成時に発現するウシ内在性レトロウイルスの機能解析、5) 異種間臓器移植や再生医療などで問題となる動物由来内在性レトロウイルスの研究、6) ガンマレトロウイルスの内在化と種間感染のモデルとしてのコアラレトロウイルスの解析。

1) ウシ内在性レトロウイルス K2 のエンベロップ蛋白質の機能不全は細胞内トラフィック不全と関連する

長い年月とともに蓄積された変異により内在性レトロウイルスは感染性を失うが、変異がレトロウイルスの蛋白質の機能に及ぼす影響については不明な点が多い。レトロウイルスのエンベロップ蛋白質 (Env) は、細胞膜とウイルスの膜と融合を引き起こす。我々は、最近、Env のオープンリーディングフレームが完全に保持された内在性レトロウイルスを 2 種類発見し、ウシ内在性レトロウイルス K1 (BERV-K1) ならびに K2 (BERV-K2) と命名した。BERV-K2 の Env は BERV-K1 の Env のアミノ酸配列は類似しており、ともにベータレトロウイルス属に分類される。BERV-K1 の Env は Fematri-1 と呼ばれ、ウシの胎盤において、細胞同士を融合させる機能があるが、BERV-K2 の Env は、ウシ体内でわずかにしか発現していない。さらに組換え BERV-K2 Env は、膜融合能を欠損しているが、それは、外被 (SU) Env と膜貫通 Env の開裂が不全であるため起こる。今回我々は、Fematri-1 と BERV-K2 Env 蛋白質のキメラを作製し、BERV-K2 Env の成熟欠損と、同蛋白質の小胞体からトランスゴルジネットワークへの移動の欠陥とに相関があることを見いだした。さらに、その欠陥の原因が BERV-K2 の SU Env の 65 アミノ酸領域にあることを突き止めた。本研究により、レトロウイルスの SU Env が細胞内トラフィックにも関与していることが初めて明らかとなった。また本研究は、Fematri-1 と Fematri-1 関連 Env の成熟過程の理解に役に立つものと考えられる。

2) 日本におけるネコモルビリウイルスの分離とウイルス力価測定法の確立

ネコモルビリウイルス (Feline morbillivirus : FmoPV) 感染症は、ネコの新興ウイルス感染症であり、尿細管間質性腎炎との関連が疑われている。2012 年に香港ではじめて報告されたが、他の国におけるウイルス分離の報告はなかった。我々は日本で初めて FmoPV の分離に成功し、その性状を調べた。日本国内の動物病院を受診したイエネコ 13 匹の尿を RT-PCR 検査したところ、3 匹が陽性であった。これら陽性個体から FmoPV SS1、SS2 および SS3 の 3 株を分離した。FmoPV に感染した CRFK 細胞では融合を伴う CPE が観察され、間接蛍光抗体法により感染細胞の細胞質に FmoPV の N 蛋白質の存在が示された。また電子顕微鏡による観察では、多形性のウイルス粒子のエンベロップ上に明瞭な糖蛋白質のスパイクがみられた。H および L 遺伝子の系統解析では FmoPV の遺伝的多様性が証明された一方、ポジティブセクションは受けていないことがわかった。分離したネコモルビリウイルス株を用い、間接蛍光抗体法によるウイルス力価の測定法を確立し、ウイルス

の増殖速度を明らかにした。また熱安定性を調べることにより、ウイルス性状と感染予防についての知見を得た。

3) 外来性レトロウイルスの感染を補助する内在性レトロウイルス由来可溶性蛋白質 (FeLIX) の血中における存在の証明

T リンパ球指向性猫白血病ウイルス (FeLV-T) は、FeLV の高病原性サブタイプであり、イエネコに重篤な免疫不全を引き起こす。FeLV-T のエンベロープでは、ガンマレトロウイルスに共通する PHQ モチーフが壊れており、宿主の細胞膜に融合することができない。FeLV-T の感染には、内在性ネコ白血病ウイルス (enFeLV) のエンベロープ遺伝子の一部である、FeLIX 蛋白が必要である。FeLIX は正常な PHQ モチーフを含み、FeLV-T の受容体非依存性感染を誘導する。Pit1 はネコのほぼすべての組織に発現しているが、FeLIX 蛋白の発現はリンパ系組織の一部に限られている。したがって FeLV-T の感染は、FeLIX を発現する細胞に限局すると考えられていた。しかし我々は、FeLIX がリンパ系組織で発現する可溶性の因子であることから、血流に乗って全身組織に分布すると考えた。そこでシュードタイプアッセイにより、様々な哺乳類の血清中の FeLIX 活性を測定した。イエネコの血清中で機能的なレベルの FeLIX 活性がみられたことから、FeLIX はイエネコの血中に存在し、全身組織における FeLV-T の感染を補助していることが分かった。血清中の FeLIX 活性はイエネコにおいてのみ検出され、他の種では検出されなかった。内在性レトロウイルスのエンベロープ蛋白の一部が血液を介して全身に分布し、病原性の外来性レトロウイルスの感染を補助するという報告は世界初である。

4) ニホンザル由来サルフォーミウイルスの感染性クローンの作製と系統解析

レトロウイルス科に属するフォーミーウイルス (FV) は霊長類、ウシ、ウマおよびネコなどの様々な動物より分離されている。ニホンザルは我が国固有のマカク属のサルであり、国内において様々な集団 (群) を形成している。本研究では京都府京都市嵐山由来のニホンザル 2 頭ならびに鳥取県八頭郡若桜町由来のニホンザル 2 頭の血液サンプルから、マウス線維芽細胞 (MDTF 細胞) を用いてウイルス分離を試みた。その結果、すべての血液サンプルより FV の分離に成功した。分離されたウイルスは AR1 株、AR2 株、WK1 株ならびに WK2 株と命名した。WK1 株の全塩基配列を決定したところ、アカゲザル由来の FV と約 89% のホモロジーを有することがわかった。さらに、今回塩基配列を決定したクローンは、感染性を有することを確認した。次に、AR1 株、AR2 株ならびに WK2 株のポリメラーゼ遺伝子領域の部分配列を決定し、WK1 株の配列とともに系統解析を行った。その結果、ニホンザルの FV には少なくとも 2 つの系統があることがわかった。1 つは WK1 株と WK2 株のクラスターでタイワンザル由来の FV と近縁であった。一方、AR1 株と AR2 株は、アカゲザル由来の FV と近縁であった。さらに、4 頭のニホンザルのミトコンドリア D ループの配

列を決定し、系統解析を行った。その結果、フォーミーウイルスの系統解析とは異なり、ニホンザル、タイワンザルおよびアカゲザルはそれぞれ別個のクラスターを形成した。

5) ヒヒ内在性ウイルスの感染性クローンの作製と出芽機構の解析

ヒヒ内在性ウイルス (BaEV) はヒヒの胎盤から分離された感染性の内在性ガンマレトロウイルスである。BaEV に近縁な内在性レトロウイルスがアフリカ産のサル (アフリカミドリザルなど) においても存在することがわかっている。最近、アフリカミドリザルの腎臓由来細胞である Vero 細胞を薬剤刺激することで、BaEV 様のウイルス粒子が産生誘導されることが報告された。このことから、アフリカミドリザル由来細胞を用いて製造される生物学的製剤中に BaEV 様ウイルスが迷入する可能性があると考えられた。本研究では BaEV の感染性クローンを作製し、その出芽機構を解析した。BaEV の感染性クローンは持続感染細胞より DNA を抽出し、PCR 法でゲノム全長を増幅したのち、プロウイルス型に組み直すことで作製した。感染性は LacZ マーカーレスキューアッセイで確認した。作製した感染性クローンの全塩基配列を同定した結果、L ドメインと想定されるモチーフ (PSAP モチーフならびに PPPY モチーフ) を 2 カ所同定した。これらのモチーフの機能を確認するために、各変異体を作製し、ウェスタンブロット解析ならびに LacZ マーカーレスキューアッセイを用いて出芽効率を比較した。その結果、PPPY モチーフが BaEV の出芽に重要な L ドメインであることを明らかとなった。さらに、BaEV の出芽の際に、宿主因子である Vps4A 及ぶ Vps4B が関与しているかどうかを調べたところ、どちらの宿主因子も BaEV の出芽に関与していることが明らかとなった。今回得られた知見は BaEV 様ウイルスの生物学的製剤への迷入を防止するために有用であると考えられる。

Laboratory of Viral Pathogenesis

Members

Professor	Yoshio Koyanagi
Assistant Professor	Hiroataka Ebina Kei Sato
Research Fellow	Junko Shibata Takeuchi Tomoko Kobayashi Rokusuke Yoshikawa
Graduate Student	Yuka Kanemura, Eri Yamada, Yuichi Kimura, Shuhei Ueda, Yusuke Nakano
Technical assistant	Naoko Misawa

Introduction

We have been focusing on basic researches of retroviruses, including human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), simian immunodeficiency virus (SIV), and other animal retroviruses. The goal of our researches is to elucidate the molecular mechanisms of viral pathogenesis and to find the strategy for treatment. We generated a humanized mouse model that NOG mice are transplanted with human hematopoietic stem cells (HSCs). Using this model, we found a mechanism how individual APOBEC3 proteins suppress HIV-1 replication *in vivo*. HIV-1 replication was severely attenuated in humanized mice by APOBEC3 proteins, particularly APOBEC3F and APOBEC3G through inducing G-to-A hypermutations, while at the same time APOBEC3F induced viral diversification (Sato *et al. PLOS Pathog.*, 2014). We also showed how APOBEC3F and APOBEC3G differ in their anti-HIV-1 modes from an experimental-mathematical investigation (Kobayashi *et al, J. Virol*, 2014). We have other series of research projects from individual genome analysis combined with cell culture systems. We produced genome-editing tools targeting HIV-1 itself using clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 and transcription activator-like effector nucleases (TALENs) systems, and found TAR region of HIV-1 LTR is a proper target to remove HIV-1 provirus.

Topics

1) HIV-1 infection in humanized mice: K. SATO, N. MISAWA, J. S. TAKAKEUCHI, T. KOBAYASHI, E. YAMADA, and Y. KOYANAGI

Several APOBEC3 proteins, particularly APOBEC3F and APOBEC3G, induce G-to-A hypermutations in HIV-1 genome and abrogate viral replication in experimental systems, but their relative contributions to controlling viral replication and viral genetic variation *in vivo* have not been elucidated. On the other hand, an HIV-1-encoded protein, Vif, can degrade these APOBEC3 proteins via a ubiquitin/proteasome pathway. Although APOBEC3 proteins have been widely considered as potent restriction factors against HIV-1, it remains unclear which endogenous APOBEC3 protein(s) affect HIV-1 propagation *in vivo*. Here we use a humanized mouse model and HIV-1 with mutations in Vif motifs that are responsible for specific APOBEC3 interactions, DRMR/AAAA (4A) or YRHHY/AAAAA (5A), and demonstrate that endogenous APOBEC3F and APOBEC3G exert strong anti-HIV-1 activity *in vivo*. We also show that the growth kinetics of 4A HIV-1 negatively correlated with the expression level of APOBEC3F. Moreover, single genome sequencing analyses of viral RNA in plasma of infected mice revealed that 4A HIV-1 is specifically and significantly diversified. Furthermore, a mutated virus that is capable of using both CCR5 and CXCR4 as entry coreceptor is specifically detected in 4A HIV-1-infected mice. Taken together, our results demonstrate that APOBEC3F and APOBEC3G fundamentally work as restriction factors against HIV-1 *in vivo*, but at the same time, that APOBEC3F is capable of promoting viral diversification and evolution *in vivo* (Sato and Takeuchi *et al*, *PLOS Pathog.*, 2014).

2) Evolutionary arms race of primates and their lentiviruses: K. SATO, T. KOBAYASHI, J. S. TAKEUCHI, R. YOSHIKAWA, E. YAMADA, Y. NAKANO, Y. KIMURA, N. MISAWA and Y. KOYANAGI

Primate lentiviruses including HIV-1 and SIVs evolved through the acquisition of antagonists against intrinsic host restriction factors, such as tetherin. It is widely accepted that HIV-1 has emerged by zoonotic transmission of SIV in chimpanzee (SIVcpz), and that SIVcpz Nef protein antagonizes chimpanzee tetherin. Although Nef of SIVcpz shares a common ancestor with that of SIVrcm, an SIV in red-capped mangabey (*Cercocebus torquatus*), it remains unclear whether SIVrcm Nef can antagonize tetherin of its natural host. In this study, we determined the sequence of red-capped mangabey tetherin for the first time and directly demonstrate that SIVrcm Nef is the *bona fide* antagonist of red-capped mangabey tetherin. These findings suggest that SIVrcm Nef is the functional ancestor of SIVcpz Nef. Moreover, molecular phylogenetic analyses reveal that tetherins of the genus *Cercocebus* have experienced adaptive evolution, which is presumably promoted by primate lentiviruses (Kobayashi *et al*, *Sci. Rep.*, 2014).

3) Experimental-Mathematical Investigation of anti-viral activity of APOBEC3 proteins: T. KOBAYASHI, J. S. TAKEUCHI, K. SATO, S. IWAMI and Y. KOYANAGI

HIV-1, the causative agent of AIDS, hijacks lines of cellular proteins for its replication. On the other hand, accumulating evidence has revealed that human cells intrinsically possess anti-HIV-1 proteins. Human APOBEC3 proteins are cellular cytidine deaminases, and certain APOBEC3 proteins, particularly APOBEC3F and APOBEC3G, are the intrinsic restriction factors against HIV-1. APOBEC3F and APOBEC3G are incorporated into assembling HIV-1 particles and brought into the newly infected cells. During reverse transcription (RT) in the infected cells, these APOBEC3 proteins enzymatically convert C in the viral minus-strand DNA to U, resulting in G-to-A mutation in the nascent plus-strand DNA. These mutations can become nonsynonymous or even lethal, which severely debilitates subsequent viral replication. In addition, it has been reported that the incorporated APOBEC3F and APOBEC3G potentially impair the HIV-1 RT process even prior to the insertion of G-to-A mutations. Moreover, this inhibition is independent of these APOBEC3s' deaminase activity. These findings indicate that APOBEC3F and APOBEC3G potentially inhibit HIV-1 replication through at least two distinct modes: (i) deaminase activity-dependent G-to-A mutations of viral DNA and (ii) impairment of viral RT independent of deaminase activity. However, how much of the inhibition of HIV-1 replication by APOBEC3 proteins is attributed to each of these two modes has not been quantitatively revealed. Through experimental and mathematical investigation, here we quantitatively demonstrated that 99.3% of the antiviral effect of APOBEC3G is dependent on its deaminase activity, whereas 30.2% of the antiviral effect of APOBEC3F was attributed to deaminase-independent ability. This is the first report quantitatively elucidating how APOBEC3F and APOBEC3G differ in their anti-HIV-1 modes (Kobayashi *et al*, *J. Virol*, 2014).

4) Genome-Editing for HIV cure: H. EBINA, N. MISAWA, Y. KANEMURA, S. UEDA and Y. KOYANAGI

Latent infection occurs when the HIV-1 provirus becomes transcriptionally inactive, resulting in a latent reservoir that has become the main obstacle in preventing viral eradication from HIV-1 infected individuals. While anti-retroviral therapy (ART) has dramatically decreased mortality from HIV-1 infection, there is currently no effective strategy to remove the latent form of HIV-1 proviruses. We validated the HIV-1 proviral-editing strategy using genome-editing technology, CRISPR/Cas9 system and demonstrated that HIV proviral DNA could be excised from the chromosomal DNA of T cells after introduction of a RNA-guided endonuclease (RGN) targeting HIV LTR (Ebina *et al*. *Sci. Rep.* 2013). Furthermore, we found that HIV replication is severely suppressed in the T cell culture when the RGN targeting LTR was constitutively transduced with lentiviral vector. Alternatively, we constructed TALENs targeting the same HIV LTR site that resulted in more than 80% of lentiviral vector DNA being successfully removed from the T cell lines when mRNA is used as the vehicle for transfection. Our results indicated that genome-editing technologies

targeting LTR have a great potential to suppression of HIV-1 replication and can be an alternative strategy for HIV therapy for cure.

We are developing several strategies for genome manipulation based on genome-editing technology, also. RGN mediated DNA double strand break promote not only non-homologous end joining (NHEJ)-mediated indel mutation but also homology-directed repair (HDR) mediated precise mutation at the cleaved site. We established systematic method introducing homozygous gene replacement for alleles using RGN mediated HDR reaction. We have also developed live imaging system of HIV provirus using GFP-tagged LacO/I system combined with RGN mediated HDR reaction. This specific insertion of LacO repeats sequence enabled to chase HIV provirus localization in nuclei of lived cells.

List of Publications

Sakamoto T, Kobayashi M, Tada K, Shinohara M, Io K, Arai Y, Yamashita K, Shindo K, Kadowaki N, Koyanagi Y, Takaori-Kondo A. CKIP-1 is an intrinsic negative regulator of T-cell activation through an interaction with CARMA1. **PLOS One** 9:e85762, 2014.

Imahashi, M., Izumi, T., Watanabe, D., Imamura, J., Matsuoka, K., Ode, H., Masaoka, T., Sato, K., Kaneko, N., Ichikawa, S., Koyanagi, Y., Takaori-Kondo, A., Utsumi, M., Yokomaku, Y., Shirasaka, T., Sugiura, W., Iwatani, Y., and Naoe, T. Lack of association between Intact/Deletion polymorphisms of the *APOBEC3B* gene and HIV-1 risk. **PLOS One** 9:e92861, 2014.

Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H. EFdA, a Reverse Transcriptase Inhibitor, Potently Blocks HIV-1 Ex Vivo Infection of Langerhans Cells within Epithelium. **J. Invest. Dermatol.** 134:1158-61, 2014.

Kobayashi, T.‡, Koizumi, Y.‡, Takeuchi, JS., Misawa, N., Kimura, Y., Morita, S., Aihara, K., Koyanagi, Y., Iwami, S.*, and Sato, K.* Quantification of deaminase activity-dependent and -independent restriction of HIV-1 replication mediated by APOBEC3F and APOBEC3G through experimental-mathematical investigation. **J. Virol.**, 88:5881-5887, 2014. *Correspondence; ‡Equal contribution.

Ikeda, H., de Boer, RJ., Sato, K., Morita, S., Misawa, N., Koyanagi, Y., Aihara, K., and Iwami, S. Improving the estimation of the death rate of infected cells from time course data during the acute phase of virus infections: application to acute HIV-1 infection in a humanized mouse model. **Theor. Biol. Med. Model.** 11:22, 2014.

Kobayashi, T.‡, Takeuchi, JS.‡, Ren, F.‡, Matsuda, K.‡, Sato, K.‡*, Kimura, Y., Misawa, N., Yoshikawa, R.,

Nakano, Y., Yamada, E., Tanaka, H., Hirsch, VM. and Koyanagi, Y. Characterization of red-capped mangabey tetherin: implication for the co-evolution of primates and their lentiviruses. **Sci. Rep.** 4:5529, 2014. *Correspondence; ‡Equal contribution.

Sato, K.‡*, Takeuchi, JS.‡, Naoko Misawa, Izumi, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Iwami, S., Takaori-Kondo, A., Hu, W-S., Aihara, K., Ito, M., An, DS., Pathak, VK. and Koyanagi, Y. APOBEC3D and APOBEC3F potentially promote HIV-1 diversification and evolution in humanized mouse model. **PLOS Pathog.** 10:e1004453, 2014. *Correspondence; ‡Equal contribution.

佐藤佳、小柳義夫：HIV-1 のウイルス学、HIV 感染症と AIDS、**最新医学社**、pp. 32-38, 2014.

蝦名博貴、小柳義夫：ゲノム編集技術を用いたエイズ根治療法の可能性、今すぐ始めるゲノム編集、**羊土社**、p. 21, 2014.

小柳義夫：単純ヘルペスウイルスの感染防御にかかわる細胞性因子 APOBEC1 と SAMHD1、**臨床免疫・アレルギー科**、62, pp.268-274, 2014.

佐藤佳：ヒト化マウスモデルを用いた HIV 感染病態の理解と解明、感染症国際研究センターシンポジウム（招待講演）、東京、2014 年 3 月 18 日

Sato, K., Shibata, J., Izumi, T., Misawa, N., Kobayashi, T., Kimura, Y., Ito, M., Pathak, V. K., Koyanagi, Y. APOBEC3F potentially promotes HIV-1 diversification and evolution in humanized mouse model, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA, 19-24 May, 2014.

蝦名博貴、三沢尚子、金村優香、小柳義夫：ゲノム編集法のエイズ治療への展望、第 16 回白馬シンポジウム、熊本、2014 年 6 月 14 日

Koyanagi Y., Misawa N., Sato K., Ebina H., HIV strategy for acceleration of viral replication in vivo and eradication approach of HIV proviral DNA. 9th International Symposium of the Institute Network, Osaka. 18-19 June, 2014.

Ikeda, H., Nakaoka, S., Sato, K., Iwami, S. Quantification of acute viral infection dynamics in HIV-1 infected humanized mouse using delay differential equations：日本数理生物学会、大阪、2014 年 7 月 30 日

Koyanagi, Y., Sato, K., Kobayashi, T., Takeuchi, J. S. Characterization of primate tetherin: co-evolution of

primates and their lentiviruses (invited), 4th International Congress on Asian Primates, Bogor, Indonesia, 18-21 August, 2014.

佐藤佳、竹内（柴田）潤子、小林朋子、吉川禄助、山田英里、中野雄介、任鳳蓉、田中博、小柳義夫：レンチウイルスと宿主の進化的軍拡競争の分子メカニズム，日本進化学会第16回大会（招待ワークショップ）、高槻、2014年8月22日

佐藤佳：HIV感染ヒト化マウスモデルにおける宿主因子-ウイルス因子の相克，第11回湯河原キャンプ、湯河原、2014年9月17日

蝦名博貴：ゲノム編集法を用いたウイルスゲノムの改変～HIV治療への応用．第8回日本ゲノム微生物学会若手の会（招待講演）、静岡、2014年9月29日、国際学会

Koyanagi, Y., Sato, K., Conflicts and benefits between primate lentiviruses and host restriction factors, 15th Kumamoto AIDS Seminar (invited), Kumamoto, Japan, 1-3 October, 2014.

金村優香、蝦名博貴、三沢尚子、中野雄介、小柳義夫：両アリル点変異培養細胞の作出法の開発、第4回ゲノム編集研究会、広島、2014年10月6日

蝦名博貴：ゲノム編集のHIVへの応用、第4回ゲノム編集研究会、広島、2014年10月7日

吉川禄助：竹内（柴田）潤子、山田英里、中野雄介、木村雄一、宮沢孝幸、佐藤佳、小柳義夫：FIVサブタイプ間におけるVifタンパク質の機能的相違性、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10日

佐藤佳、竹内（柴田）潤子、小林朋子、三沢尚子、山田英里、中野雄介、吉川禄助、小柳義夫：ヒト化マウスモデルを用いたエイズウイルス適応進化メカニズムの解明、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10日

山田英里、竹内（柴田）潤子、吉川禄助、小林朋子、任鳳蓉、松田健太、中野雄介、木村雄一、三沢尚子、田中博、Hirsch Vanessa、佐藤佳、小柳義夫：TetherinとNefの相克から読み解く霊長類レンチウイルスの進化的軍拡競争、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月11日

蝦名博貴、金村優香、三沢尚子、佐久間哲史、小林朋子、山本卓、小柳義夫：TALEN法によるHIVプロウイルスの高編集効果、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月12日

Ebina H. Perspective of genome editing technologies for viral diseases. The 27th Annual Meeting of Japanese

Association for Animal Cell Technology (invited), Kokura, 10-14 November, 2014.

吉川禄助、山田英里、中野雄介、任鳳蓉、田中博、宮沢孝幸、佐藤佳、小柳義夫:ネコ APOBEC3Z3 の遺伝子多型と FIV Vif 感受性の関連、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月 26 日

蝦名博貴、金村優香、小柳義夫:ゲノム編集法を用いた HIV プロウイルスのライバイメージングシステムの構築、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月 26 日

蝦名博貴:ゲノム編集法を用いたエイズ治療戦略の展望 第 28 回日本エイズ学会学術集会 (招待講演)、大阪、2014 年 12 月 3 日

蝦名博貴:感染者からのウイルスの除去 市民公開講座 HIV 感染症の Cure は可能か? - 基礎研究者の挑戦 (招待講演)、大阪、2014 年 12 月 5 日

【その他】

アウトリーチ活動として、以下の活動を行った。

- 1) 小柳義夫、エイズウイルスの過去と現在、第 58 回品川セミナー、品川、2014 年 7 月 4 日
- 2) 京都大学 11 月祭「研究室企画」に展示・発表を行った . 2014 年 11 月 23 日
- 3) 大阪府立大手前高等学校 (スーパーサイエンスハイスクール) の生徒が研究室見学に訪れ、講義を行った . 2014 年 12 月 11 日

教授	小柳義夫
助教	蝦名博貴 佐藤佳
研究員	竹内（柴田）潤子 小林朋子 吉川禄助
大学院生	金村優香、山田英里、木村雄一、上田修平、中野雄介（特別研究学生）
教務補佐員	三沢尚子

木村雄一は平成 26 年 3 月に医科学修士課程を修了し、生命科学研究科博士後期過程に入学した。小林朋子は平成 26 年 4 月に東京農業大学の助教として就職した。また、山田英里は医学研究科博士課程に、上田修平は生命科学研究科修士課程に、平成 26 年 4 月にそれぞれ入学した。平成 26 年 4 月から吉川禄助が博士研究員として、熊本大学より中野雄介が特別研究学生として新たに加わった。小柳義夫は平成 26 年 4 月から研究所所長になった。竹内（柴田）潤子は平成 26 年 7 月に退職した。

以下のテーマについて研究を遂行している。

1. ヒト化マウスを用いた HIV-1 アクセサリ蛋白質の解析

培養細胞を用いた研究から、ヒトの APOBEC3 タンパク質（A3）、特に A3F と A3G は、HIV-1 粒子に取り込まれ、ウイルスゲノムに G → A 変異を挿入することによってその感染を阻害することが明らかとなっている。一方、HIV-1 アクセサリタンパク質のひとつである Vif は、ユビキチン-プロテアソーム経路依存的に A3 を分解し、そのウイルス粒子への取り込みを阻害する。また、A3 は強力な抗 HIV-1 タンパク質として知られている一方で、A3 によって挿入される G → A 変異が、ウイルスの多様化（diversification）を促進するという報告もある。しかしながら、HIV-1 感染病態を再現できる動物モデルが存在しなかったため、生体内 HIV-1 増殖過程において、(1) 内在的に発現するどの A3 が抗ウイルス活性を示すのか；(2) A3 による G → A 変異は HIV-1 の多様化（diversification）に影響を与えるのか、については不明であった。本研究では、内在性 A3 が HIV-1 感染病態に与える影響を解明することを目的として、HIV-1 感染ヒト化マウスモデルを用いた実験

を行った。

CCR5 指向性 HIV-1 (NLCSFV3 株) 野生型、A3G を分解できない変異体 Vif をコードする HIV-1 4A、A3F を分解できない変異体 Vif をコードする HIV-1 5A をそれぞれヒト化マウスに接種した。血漿ウイルス RNA 量を real-time RT-PCR 法で、血中 CD4T 細胞数を flow cytometry/hematometry 法で経時的に定量した。また、感染後 6 週齢のマウスを解剖し、脾臓におけるプロウイルス DNA 配列を PCR 法で、血漿中のウイルス RNA 配列を RT-PCR/single genome sequencing 法でそれぞれ解析した。その結果、4A HIV-1 および 5A HIV-1 のヒト化マウスにおける増殖効率は、野生型 HIV-1 に比して有意に低く、5A HIV-1 の増殖効率は、4A HIV-1 に比して有意に低かった。また、プロウイルス DNA 配列を解析した結果、4A HIV-1 感染マウスでは GA → AA 変異が顕著に観察されたのに対し、5A HIV-1 感染マウスでは GG → AG 変異が顕著に観察された。さらに興味深いことに、血漿中のウイルス RNA 配列は、脾臓のプロウイルス DNA で観察された変異パターンと異なっており、4A HIV-1 の多様性は、野生型 HIV-1 および 5A HIV-1 のそれに比べ、統計的に有意に高かった (図 1)。さらに、CXCR4 を共受容体とするウイルスが、4A HIV-1 感染マウス特異的に出現していることが明らかとなった。以上の結果から、生体内 HIV-1 増殖過程において、CD4T 細胞に内在的に発現する A3F、A3G が共に抗ウイルス活性を示すこと、A3G の抗ウイルス活性は A3F のそれよりも強力であることが示唆された。一方で、興味深いことに、A3F 依存的 G → A 変異は、ウイルスの多様化・進化を促進しうることが強く示唆された (Sato and Takeuchi *et al. PLOS Pathog.*, 2014)。

(佐藤佳、竹内 (柴田) 潤子、三沢尚子、小林朋子、木村雄一、小柳義夫)

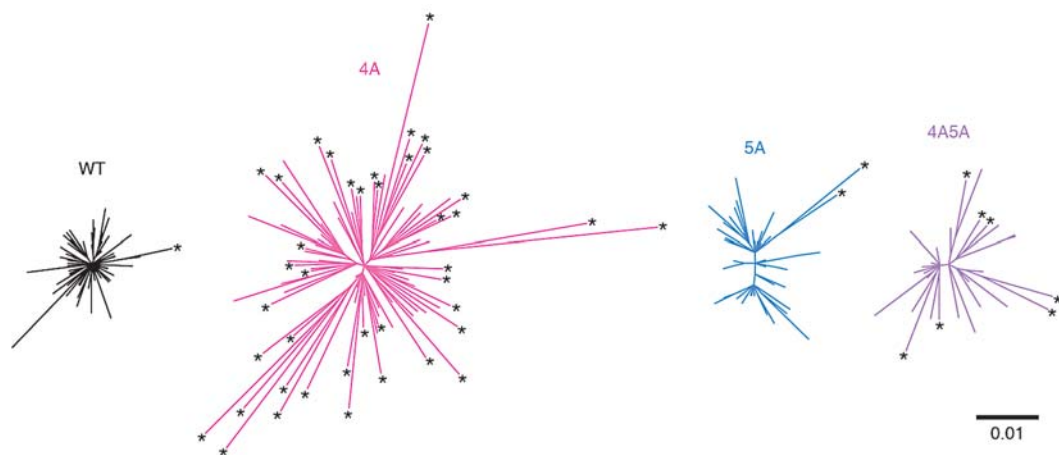


図 1 ヒト化マウス脾臓におけるプロウイルスの多様性。ウイルス DNA の系統樹解析を行った。

2. 霊長類レンチウイルスと宿主因子の進化的関係性の解析

テザリンという細胞性膜蛋白質は、多くのウイルスの産生効率を強力に抑制する。一方、レンチウイルスは新たな蛋白質を獲得して、このテザリンの抗ウイルス活性を無力化していることが知ら

れている。HIV-1 の場合には Vpu が、近縁の旧世界ザルのウイルスである SIV の場合には Nef がそれぞれ抗テザリン機能を担う。

HIV-1 は、約 100 年ほど前にチンパンジーの免疫不全ウイルス (SIVcpz) がヒトに種間伝播・適応進化して誕生したと考えられている (Gao et al, *Nature*, 1999; Worobey et al, *Nature*, 2008)。興味深いことに、チンパンジーのテザリンは、SIVcpz の Nef によって拮抗阻害される。また、SIVcpz は旧世界ザルの SIV の組換えにより誕生したこと、および、SIVcpz Nef はアカエリマンガベイ (Red-capped mangabey; RCM) に感染するウイルス SIVrcm に由来することがそれぞれ示唆されている (Bailes et al, *Science*, 2003)。しかしながら、RCM テザリンはいまだ同定されておらず、SIVrcm Nef が RCM テザリンのアンタゴニストとして作用しうるか否かは不明であった。本研究では、RCM テザリン配列を決定し、分子系統学と実験ウイルス学の融合研究により、霊長類と霊長類レンチウイルスの進化的軍拡競争の様式の一端を明らかにした (Kobayashi et al, *Sci Rep*, 2014)。

(小林朋子、竹内 (柴田) 潤子、佐藤佳、吉川禄助、山田英里、中野雄介、木村雄一、小柳義夫)

3. APOBEC3 の抗ウイルス活性の数理科学的解析

上述の通り、ヒトの A3 タンパク質、特に A3F と A3G は、HIV-1 粒子に取り込まれ、抗ウイルス作用を示す。これまでの研究から、A3 による抗ウイルス作用は、ウイルスゲノムに G → A 変異を挿入と、ウイルス逆転写反応の阻害の 2 つの経路によることが明らかとなっている。しかしながら、A3F, A3G それぞれについて、上記の 2 つの抑制経路がそれぞれどの程度の寄与率によって抗ウイルス効果を発揮しているのかは明らかとなっていない。本研究では、実験ウイルス学データを数理科学的に解析することにより、A3G および A3F による HIV-1 複製抑制能の差異を定量的に解明することに成功した。具体的には、A3G の抗ウイルス活性の 99.3% は第 1 の機構 (酵素活性依存的経路) によるものであること、一方、A3F の抗ウイルス活性の 30.2% は第 2 の機構 (酵素非活性依存的経路) によるものであることが明らかとなった。これらの結果は、従来の実験科学的手法のみで明らかにすることが不可能であり、ウイルスと宿主タンパク質の相互作用により引き起こされる多元的事象を数理科学的手法で解析することによって初めて明らかとなった。本研究は岩見真吾博士 (九州大学) との共同研究である (Kobayashi et al. *J. Virol.*, 2014)。

(小林朋子、竹内 (柴田) 潤子、佐藤佳、岩見真吾、小柳義夫)

4. HIV 感染細胞除去に向けたゲノム編集法

HIV は細胞染色体に自己ゲノムを組み込み、そのプロウイルスを鋳型としてウイルス粒子を産生する。潜伏感染細胞のプロウイルスの除去が HIV 感染症治癒への課題であるが、現行の抗 HIV 剤併用療法では不可能である。我々は、細胞ゲノムの特定の配列に切断と変異を誘導する TALENs ならびに CRISPR/Cas9 などのゲノム編集技術を用いて、プロウイルスを直接標的とする新規 HIV 治

療戦略の開発を行なっている。これまで、HIV LTR を標的とする guide RNA と Cas9 を HIV 感染細胞に導入することにより、LTR に二本鎖 DNA 切断 (DSB) と変異が導入され、潜伏感染 HIV プロウイルスの不活性化、ならびに除去が可能であることを見いだした (図 2) (Ebina *et al. Sci. Rep.* 2013)。また、レンチウイルスベクター導入系を用いて LTR 標的 CRISPR/Cas9 を T 細胞に恒常的に発現させる事で、細胞に HIV 複製に対する抵抗性を付与することが可能であることも見出した。さらに、ゲノム編集の特異性 (安全性) と編集効率の向上を目的として、HIV LTR を標的とする TALENs を新たに構築し、そのプロウイルス編集効果と導入法を検討した。そして、LTR 標的 TALENs は強力なプロウイルス不活性化効果を有すること、その導入核酸を mRNA とすることで HIV プロウイルス編集効率を著しく向上させることが可能である事を見いだした (Ebina *et al. PLoS One*, in press)。これら結果は、ゲノム編集技術が HIV 感染症の完全治癒を現実化するまったく新しい治療法となる可能性を強く示唆している (蝦名博貴、三沢尚子、金村優香、上田修平、小柳義夫)。

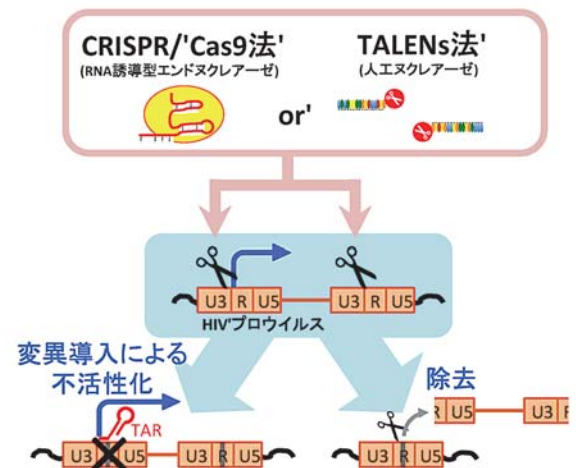


図 2 ゲノム編集法を用いたプロウイルスの除去

5. ゲノム編集技術開発

ゲノム編集法を用いた配列特異的な DSB の誘導は、non-homologous end joining (NHEJ) 修復によるランダムな indel 変異だけではなく、HDR 修復経路による正確な相同組換えも誘導可能である。しかしながら、その HDR 相同組換え頻度は低く、両アリル変異導入細胞の作出は困難である。そこで我々は、HIV 増殖に必須な宿主細胞因子である lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) を標的として、HDR 修復経路により、両アリルに変異を導入し、その細胞を選択する実験手法を確立した。また、ゲノム編集法を用いた HDR 相同組換え法を応用し、HIV プロウイルス特異的に LacO 反復配列を挿入する手法も確立した (図 3)。そして、その細胞に GFP 融合 LacI を発現させることで、HIV プロウイルス

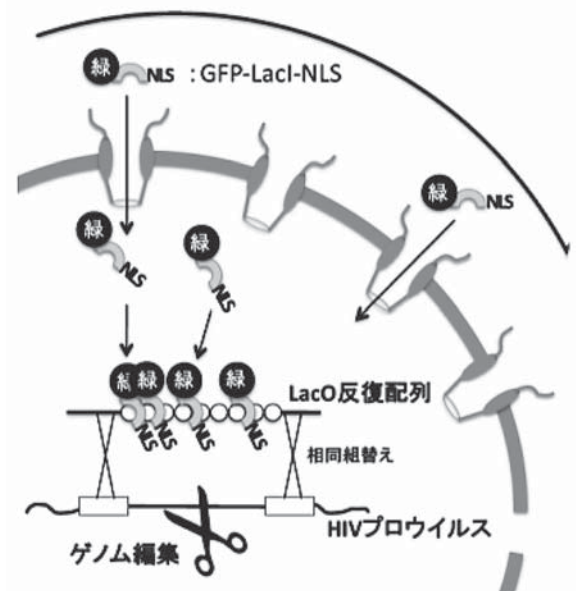


図 3 ゲノム編集を利用した HIV プロウイルス可視化方法概要図

スの動態の追跡が可能であることを見出した。細胞染色体に組込まれたプロウイルスの発現制御は、核内空間に格納されたクロマチンの構造変化と、核内区画の移動、核内構造体と相互作用によりダイナミックに管理されていると予想されており、本システムを用いることで HIV プロウイルスの潜伏化、活性化の核内動制御システムの解明が期待できる（蝦名博貴、三沢尚子、金村優香、上田修平、小柳義夫）。

Laboratory of Virus Control

Members

Professor	Masao Matsuoka
Lecturer	Jun-ichirou Yasunaga
Assistant Professor	Kazuya Shimura
Research Fellow	Kenji Sugata
	Guangyong Ma
	Yuichi Mitobe
Graduate Student	Keiko Yasuma, Akihiro Kawatsuki, Yu Mitagami, Mohamed Mohamed Mahgoub Mohamed Ahmed, Rie Furuta, Haruka Kinosada, Takashi Matsumoto
Medical Laboratory Technologist	Chiho Onishi
Secretary	Yu Furukawa

Introduction

Both human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and human immunodeficiency virus (HIV) are pathogenic human retroviruses. HTLV-1 promotes clonal proliferation of CD4⁺ T cells, which leads to adult T-cell leukemia (ATL), while HIV destroys CD4⁺ T cells resulting in onset of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Our research objectives are to understand the molecular mechanisms of virus-induced diseases, and to develop novel therapeutic strategies through research of these human retroviruses.

Topics

1) Molecular mechanisms of HTLV-1-induced pathogenesis: J. YASUNAGA, C. ONISHI, K. SUGATA, G. MA, Y. MITOBE, K. YASUMA, A. KAWATSUKI, Y. MITAGAMI, M. MOHAMED, R. FURUTA, H. KINOSADA, T. MATSUMOTO and M. MATSUOKA.

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is an etiological retrovirus of a neoplastic disease of CD4⁺CD25⁺ T cells, adult T-cell leukemia (ATL), and several inflammatory diseases, such as HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM) and uveitis. HTLV-1 provirus encodes two oncogenes, *tax* and *HTLV-1 bZIP factor (HBZ)*, in its plus and minus strand respectively. High proviral load is a risk factor of HTLV-1-induced diseases, and both Tax and HBZ are involved in clonal expansion of HTLV-

1-infected cells, suggesting that Tax and HBZ play important roles in pathogenesis of HTLV-1. Interestingly, HBZ has contradictory effects on various signaling pathways to Tax. Tax activates both the classical and alternative NF- κ B pathways, whereas HBZ specifically suppresses the classical NF- κ B pathway by targeting p65. Tax suppresses TGF- β signaling through inhibition of Smad proteins, although HBZ can form a complex with Smad2/3 and p300 to activate the transcription of TGF- β -responsive genes, such as *Foxp3*. Tax activates Wnt/ β -catenin (canonical Wnt) pathway, while HBZ suppresses it. In contrast, HBZ up-regulates a noncanonical Wnt ligand, Wnt5a, and supports proliferation and migration of ATL cells. Recently, we reported that two Wnt-related transcription factors, TCF-1 and LEF-1, which are critical in the development of immature T cells, counteract Tax and negatively regulate HTLV-1 replication. These findings suggest that dysregulation of the Wnt pathways by HBZ and Tax is important for expansion of HTLV-1-infected mature T cells. Anti-apoptotic phenotype is one of the hallmarks of cancer cells. We have reported that HBZ suppresses two major apoptotic pathways, such as Bim-mediated and Fas-mediated apoptosis, by attenuating the function of FoxO3a. Since Tax is also known to inhibit Fas-mediated apoptosis, it is suggested that HTLV-1-infected cells have redundant means of escaping from apoptosis. Our hypothesis is that HBZ and Tax can fine-tune the signaling and contribute leukemogenic mechanisms by complicated way. Now we are analyzing how they cooperate in development of ATL and inflammatory diseases.

2) Analysis of in vivo dynamics of STLV-1 and development of new therapeutic strategies against HTLV-1 infection using the nonhuman primate model infected with STLV-1: J. YASUNAGA, K. SUGATA, G. MA, R. FURUTA, T. MATSUMOTO and M. MATSUOKA.

Simian T-cell leukemia virus type 1 (STLV-1) is a Delta type retrovirus closely related to HTLV-1. We found that approximately 60% of Japanese macaques in Primate Research Center of Kyoto University are naturally infected with STLV-1, and reported that the dynamics of STLV-1-infected cells in the monkeys are quite similar to that of HTLV-1-infected cells in the human carriers. STLV-1 infected mainly CD4⁺ T cells, and induced the clonal proliferation of infected cells, leading to malignant transformation of T cells in a small number of the infected macaques. STLV-1 Tax and STLV-1 bZIP factor (SBZ) have the same molecular functions of HTLV-1 Tax and HBZ, respectively. These observations indicate that STLV-1-infected Japanese macaque is a highly valuable animal model to study viral pathogenesis and immune response of retroviruses, and to develop new antiviral therapeutics. Indeed, we confirmed that an anti-CCR4 monoclonal antibody, mogamulizumab, which is now clinically used for the treatment of ATL, could reduce STLV-1 proviral load in the infected Japanese macaques. We are trying to generate anti-HTLV-1 vaccines using this animal model.

3) Impact of HIV-1 infection routes on the activity of anti-HIV drugs: K. SHIMURA and M. MATSUOKA

Although HIV-1 infects CD4⁺ T cells by two pathways, cell-free and cell-to-cell infections, the latter is

more efficient due to the formation of virological synapses that act as bridges between HIV-infected and uninfected cells. In order to analyze the effect of infection pathways on drug susceptibility, we evaluated the antiviral activity of several kinds of anti-HIV drugs under both cell-free and cell-to-cell transmission using multicolor flow cytometric analysis. We observed an attenuated activity of all tested drugs under the cell-to-cell infection compared to the cell-free infection with several-fold ranges. Among the tested drugs, nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors showed the most significant changes. These results indicate that HIV-1 infection routes are one of the factors affecting the susceptibility to anti-HIV drugs.

4) Development of novel broad-spectrum antiviral agents: K. SHIMURA and M. MATSUOKA

Current anti-retroviral therapy (ART) potently suppresses HIV-1 RNA levels to below the limit of detection, and improves the prognosis of HIV-1 infected individuals. However, life-long ART induces drug resistant variants, and this is one of the major obstacles for efficient therapies. In order to develop novel small-molecule antiviral drugs that block not only wild type HIV-1 but also drug resistant variants, we screened tens of thousands of compounds and identified several that showed anti-HIV activity by inhibiting the early-phase of HIV-1 replication cycle. We focused on one identified small molecule compound, 3,4-dihydro-2*H*, 6*H*-pyrimido[1,2-*c*][1,3]benzothiazin-6-imine (PD 404182). In collaboration with the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, we are developing potent derivatives of this compound.

List of Publications

Niederer HA, Laydon DJ, Melamed A, Elemans M, Asquith B, Matsuoka M, Bangham CR. (2014) HTLV-1 proviral integration sites differ between asymptomatic carriers and patients with HAM/TSP. **Virology J.** 11, 172

Lavorgna A, Matsuoka M, Harhaj EW. (2014) A critical role for IL-17RB signaling in HTLV-1 Tax-induced NF- κ B activation and T-cell transformation. **PLoS Pathogens** 10, e1004418

Cook LB, Melamed A, Niederer H, Valganon M, Laydon D, Foroni L, Taylor GP, Matsuoka M, Bangham CR. (2014) The role of HTLV-1 clonality, proviral structure and genomic integration site in adult T cell leukemia/lymphoma. **Blood** 123, 3925-3931

Zhao, T, Satou Y and Matsuoka M. (2014) Development of T cell lymphoma in HTLV-1 bZIP factor and Tax double transgenic mice. **Arch Virol** 159, 1849-1856

Azuma Y, Kükenshöner T, Ma G, Yasunaga JI, Imanishi M, Arndt KM, Matsuoka M, and Futaki S. (2014) Controlling leucine-zipper partner recognition in cells through modifications of a-g interactions. **Chem. Commun.** 50, 6364-6367

Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J-I, Takai K and Matsuoka M. (2014) HTLV-1 bZIP factor suppresses apoptosis by attenuating the function of FoxO3a and altering its localization. **Cancer Res** 74,188-200

Miyazato P and Matsuoka M. (2014) Human T-cell leukemia virus type 1 and Foxp3 expression: viral strategy *in vivo*. **Int Immunol** 26, 419-425

松岡雅雄：ウイルスとヒトと病気：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型とエイズウイルスの最前線、第 383 回大分皮膚科医会、大分、2014 年 4 月 5 日

松岡雅雄：HTLV-1 感染が仕掛ける巧妙な罠、HBZ タンパク質：成人 T 細胞白血病（ATL）と原因ウイルス（HTLV-1）「ATL 細胞の培養から始まった HTLV-1 研究、ATL シンポジウム、高知、2014 年 5 月 24 日

Masao Matsuoka. Mechanism of leukemogenesis by human T-cell leukemia virus type I : The 12th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology, Fukuoka, 17-19 July, 2014.

Jun-ichirou Yasunaga, Naoki Sono, Masao Matsuoka : F-box and leucine-rich repeat protein 11 enhances the activity of two HTLV-1 proteins, HTLV-1 bZIP factor and tax, by regulating ubiquitination. The 4th International Symposium on Carcinogenic Spiral Infection, Immunity, and Cancer, Sapporo, 10-11 February, 2014.

松岡雅雄：HTLV-1 による発がん機構、第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014 年 9 月 25-27 日

Masao Matsuoka. How Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Causes Diseases. The 4th International Symposium on Carcinogenic Spiral Infection, Immunity, and Cancer, Sapporo, 10-11 February, 2014.

志村和也：HIV 感染経路による抗ウイルス薬感受性の変化、第 16 回白馬シンポジウム in 熊本、熊本、2014 年 6 月 13-14 日

紀ノ定明香:HBZ による CD4 陽性 T 細胞の増殖と発がん機構の解析、第 16 回白馬シンポジウム in 熊本、熊本、2014 年 6 月 13-14 日

三浦未知：ニホンザルに感染しているサル T 細胞白血病ウイルス 1 型の解析、第 16 回白馬シンポジウム in 熊本、熊本、2014 年 6 月 13-14 日

齋藤峰輝、安間恵子、松崎敏男、高嶋博、松岡雅雄：HAM 発症関連ウイルス多型が宿主・ウイルス遺伝子発現および臨床経過に及ぼす影響の解析、第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2014 年 8 月 22-24 日

Marina Penova, Jun-ichiro Yasunaga, Mineki Saito, Tomoo Sato, Satoshi Nozuma, Eiji Matsuura, Ryuji Kubota, Toshio Matsuzaki, Shuji Izumo, Hiroshi Takashima, Yoshihisa Yamano, Masao Matsuoka, Fumihiko Matsuda, Yasuharu Tabara: Genome-wide association study of HTLV-1 associated myelopathy reveals association in the HLA locus in Japanese population. The 1st Annual Meeting of the Japanese Society of HTLV-1 and Associated Deceases, Tokyo, 22-24 August, 2014.

安永純一郎、園直希、馬広勇、萩屋啓太、松岡雅雄：宿主 F-box タンパク質 FBXL11 は Tax と HBZ のユビキチン化を誘導し機能を活性化する、第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2014 年 8 月 22-24 日

金原秀一、斉藤愛記、長谷川温彦、宇都宮與、増田昌人、宮崎泰司、松岡雅雄、中村正孝、山岡昇司、増田貴夫、神奈木真理：ATL 細胞内 NF- κ B 経路活性化に対する PKR 分子と HTLV-1 LTR 領域由来転写産物の寄与、第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2014 年 8 月 22-24 日

栗林和華子、水上拓郎、滝澤和也、倉光球、浅田善久、岩間厚志、松岡雅雄、濱口功：HTLV-1 モデルマウスである HBZ-Tg マウスにおける癌幹細胞の同定と機能解析、第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2014 年 8 月 22-24 日

三田上侑生、安永純一郎、大島孝一、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor が惹起する炎症には IFN γ が重要な役割を果たす、第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2014 年 8 月 22-24 日

Guangyong Ma, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka: TCF1/LEF1 are T-cell natural HTLV-1 Tax antagonists that restrict viral expansion in thymus, The 1st Annual Meeting of the Japanese Society of HTLV-1 and Associated Deceases, Tokyo, 22-24 August, 2014.

川月章弘、安永純一郎、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は Rb タンパクと相互作用し、E2F-1/Rb 経路を改変する、第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014 年 9 月 25-27 日

安永純一郎、松岡雅雄：転写因子 TCF1、LEF1 は HTLV-1 Tax を阻害し末梢 T リンパ球への感染指

向性に関与する、第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014 年 9 月 25-27 日

三田上侑生、安永純一郎、大島孝一、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor が惹起する炎症における IFN γ の役割、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

菅田謙治、安永純一郎、三浦未知、明里宏文、小柳義夫、小原道法、松岡雅雄：Anti-CCR4 抗体は Treg と感染細胞を同時に標的にする事で、STLV-1 自然感染ニホンザルでのウイルス特異的免疫反応を活性化させる、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

志村和也、松岡雅雄：HIV 感染経路が抗ウイルス薬感受性とウイルス産生に与える影響、第 28 回日本エイズ学会学術集会、大阪、2014 年 12 月 3-5 日

Shuichi Kinpara, Yasunari Saitoh, Atsuhiko Hasegawa, Masataka Nakamura, Shoji Yamaoka, Masao Matsuoka, Takao Matsuda, Kannagi Mari. A link between HTLV-1 leukemogenesis and innate immunity; involvement of PKR in the constitutive NF κ B activation through NF- κ B signaling, The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Kyoto, 10-12 December, 2014

総説

安間恵子、松岡雅雄 (2014) ウイルスからみた ATL 発症の分子機構 血液内科 HEMATOLOGY Vol.68 No.1 1-6

安永純一郎、森下和広 (2014) HTLV-1 感染から ATL への段階的発症機構 血液内科 HEMATOLOGY Vol.68 No.1 7-11

松岡雅雄 (2014) マイナス鎖にコードされるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の病原性遺伝子 生体の科学 vol.65 No.2 182-186

松岡雅雄 (2014) ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型研究の来し方行く末 細胞 vol.46 No.6

安永純一郎 (2014) HTLV-1 の病原性 細胞 vol.46 No.6 4-7

教授	松岡 雅雄
講師	安永 純一朗
助教	志村 和也
研究員	菅田 謙治 馬 広勇
教務補佐員	水戸部 悠一
大学院生	安間 恵子、川月 章弘、三田上 侑生、古田 梨愛、 紀ノ定 明香、Mohamed Mohamed Mahgoub Mohamed Ahmed、 松本 尚
臨床検査技師	大西 知帆
秘書	古川 悠

ヒトレトロウイルスには成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) や様々な炎症性疾患の原因となるヒト T 細胞白血病ウイルス (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) と免疫系の破壊により後天性免疫不全状態 (エイズ) を引き起こすヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus: HIV) が存在する。HTLV-1 は感染細胞の増殖を促すとともに発がんのスイッチも入れてしまう。一方、HIV は CD4 陽性 T リンパ球の破壊からエイズを起こす。我々の研究室では、これらヒトレトロウイルスの研究を通じて“がん”“免疫”“ウイルス”の解析を行うと共に、その克服を目指した研究を推進している。

1) HTLV-1 による病原性発現機構の解析

HTLV-1 は、CD4 陽性 CD25 陽性 T リンパ球の悪性腫瘍である ATL、HTLV-1 関連脊髄症や HTLV-1 ぶどう膜炎といった炎症性疾患の原因となるヒトレトロウイルスである。HTLV-1 プロウイルスは、そのプラス鎖に *tax*、マイナス鎖に *HTLV-1 bZIP factor (HBZ)* をコードし、これらは共に発がん作用を有している。HTLV-1 感染者において高プロウイルス量は HTLV-1 関連疾患発症のリスクファクターであり、Tax および HBZ は共に感染細胞の増殖に関連しているため、これらのウイルス遺伝子は HTLV-1 の病原性に重要な役割を果たしていると考えられている。興味深いことに HBZ と Tax は様々なシグナル経路で拮抗する活性を有する。Tax は古典的、非古典的 NF- κ B 経路を共に活性化するが、HBZ は p65 の活性を阻害することにより NF- κ B の古典的経路を特異的に抑制する。また、

Tax は TGF- β のシグナル経路を抑制するが、HBZ は Smad2/3 および p300 と複合体を形成し、Foxp3 等の TGF- β 反応性遺伝子の転写を活性化する。Tax は Wnt/ β -catenin 経路（古典的 Wnt 経路）を活性化するのに対し、HBZ はこのシグナルを阻害する。一方で HBZ は非古典的 Wnt 経路の代表的リガンドである Wnt5a の発現を活性化し ATL 細胞の増殖と遊走を促進することが判明した。さらに、最近、我々は Wnt 関連転写因子である TCF-1 と LEF-1 が Tax と拮抗し、これらを高発現する未熟 T リンパ球では HTLV-1 の複製が抑制されることを報告した。これらの所見は HBZ および Tax による Wnt 経路の攪乱により、HTLV-1 の指向性が成熟 T リンパ球に傾き、さらにこの細胞分画の発がんを惹起する機構を説明しうるものと考えられる。アポトーシスに対する抵抗性はがん細胞の特徴の一つであるが、HBZ が転写因子 FoxO3a と結合し機能を抑制することで、Bim 誘導性および Fas 誘導性のアポトーシスを阻害することを明らかにした。Tax も Fas 誘導性のアポトーシスを抑制することが知られており、これらの所見は HTLV-1 が複数の手段をもって感染細胞のアポトーシスから逃れていることを示唆している。我々は HBZ と Tax は様々なシグナル経路を微調整しながら、細胞を発がん誘導すると考えており、現在詳細な解析を進めている。

2) STLV-1 感染霊長類を用いたウイルス感染動態の解析と HTLV-1 関連疾患の新規治療法開発

HTLV-1 とサル T 細胞白血病ウイルス 1 型 (STLV-1) は共にデルタレトロウイルス属に含まれ、構造は非常に類似している。我々の研究室は、本邦の固有種であるニホンザルの約 60% が STLV-1 に自然感染しており、STLV-1 感染と HTLV-1 感染の動態が極めて似ていることを見出している。例えば、STLV-1 は CD4 陽性 T 細胞を主な宿主とし、生体内で感染細胞のクローナルな増殖を惹起し、最終的に一部のサルは T 細胞性リンパ腫を発症する。STLV-1 は HTLV-1 Tax および HBZ に相当する STLV-1 Tax、STLV-1 bZIP factor (SBZ) をコードするが、これらの機能も HTLV-1 と同等であった。これらの所見は、STLV-1 感染ニホンザルが HTLV-1 研究に極めて有用な動物モデルであることを示しており、実際、ATL に対し臨床で使用されている抗 CCR4 抗体（モガムリズマブ）を STLV-1 感染ニホンザルに投与し、劇的なプロウイルス量の低下を認め、本モデルが治療法開発に有用であることを証明した。現在、STLV-1 感染ニホンザルをモデルとして HTLV-1 に対するワクチンの開発を進めている。

3) HIV-1 感染経路による抗ウイルス剤感受性変化

HIV-1 が主標的細胞である CD4 陽性 T リンパ球に感染する様式は、細胞外に存在するウイルス粒子によるセルフリー感染系と、既感染細胞から非感染細胞への感染伝播による細胞間感染系に大別される。我々はマルチカラーフローサイトメトリーを用いたアッセイ系を独自に構築した。この系を用いて両感染経路における抗 HIV 薬の感受性解析を行った。その結果、評価に供した抗 HIV 薬全般において、細胞間感染系での低活性化が認められ、特に核酸系逆転写酵素阻害薬においてこの

傾向は顕著であった。以上の結果から、HIV-1 の感染経路は、薬剤耐性変異と同様に、抗 HIV 薬の感受性に影響を及ぼす因子の一つであることが明らかとなった。

4) 新規抗ウイルス剤の開発

数種類の抗 HIV 薬を併せて服用する現在の標準的な抗 HIV 療法下においては持続的なウイルス RNA 量の減少が達成され HIV 感染者の予後は劇的に改善された。しかしながら、エイズ発症を防ぐためには終生にわたり治療を継続しなければならないため薬剤耐性株が出現しやすい状況にある。我々は既存の薬剤に耐性を示す変異株に対しても活性を示す新規抗 HIV 薬の開発を目指し、これまでに数種類の新規骨格を有する低分子化合物を見いだしている。そのうちの一つ、3,4-dihydro-2*H*,6*H*-pyrimido[1,2-*c*][1,3]benzothiazin-6-imine (PD 404182) は HIV 複製サイクルの初期過程に作用点を有している。現在、本学薬学研究科と共同で高活性誘導体の合成や作用点解明を進めている。

Laboratory of Primate Model

Members

Associate Professor	Tomoyuki Miura
Assistant Professor	Takayuki Hishiki
Research Fellow	Fumihiro Kato
Technical Assistant	Hiromi Mori, Kanako Matsuura
Graduate Student	Yuji Watanabe, Yuki Ishida

Introduction

It has been 32 years since human immunodeficiency virus (HIV-1), the causative agent of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) was first identified. Since then, our knowledge on HIV-1 and the pathophysiology of AIDS has grown enormously. Unfortunately, however, we have not yet developed an effective prophylactic measure or a thorough therapeutic intervention, and AIDS remains top priority among global public health agenda.

To develop effective preventive or therapeutic measures against AIDS, we need an experimental model system that recapitulates HIV-1 infection in humans. From the beginning of AIDS epidemic, HIV-1 has been known for its narrow host range. To overcome the narrow host range of HIV-1 and develop a dependable animal model for AIDS, our laboratory, first in the world, generated a chimeric simian-human immunodeficiency virus (SHIV), that carries HIV-1 derived *tat*, *rev*, *vpu* and *env* genes in the backbone of simian immunodeficiency virus, a closely related simian virus to HIV-1. Since then, SHIV/macaque model has been further developed and there are currently several SHIV strains available in the field and some of them cause acute disease followed by AIDS-like clinical manifestations.

We have been pursuing the following subjects,

1. Development and improvement of SHIV/macaque models,
2. SHIV-induced pathogenesis,
3. Development of novel vaccines and evaluation using SHIV/macaque system,
4. Identification of virus reservoir in HIV-1 infected individuals under highly active anti-retroviral therapy (HAART) using SIV infected monkeys as a model.

In addition to the abovementioned projects, we have been making efforts to establish non-human primate disease model for flavivirus infection, especially, dengue hemorrhagic fever.

Topics

1) Generation of a monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1 carrying *env* from a CCR5-tropic subtype C clinical isolate: H. OTSUKI, M. YONEDA, T. IGARASHI and T. MIURA

In the development for nonhuman primate model for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), monkey tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1mt) is expected as a new challenge virus for simian immunodeficiency virus (SIV) and simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV) which have been used conventionally. Several HIV-1mt that evade macaque restriction factors and establish infection in pig-tailed macaques (PtMs) have been reported. These monkey-tropic HIV-1s utilize CXCR4 as a co-receptor that differs from CCR5 used by most currently circulating HIV-1 strains. To develop better HIV-1mt/monkey model which can reproduce the clinical infection state of HIV-1 in human, we thought some factors were important as follows; 1) Genetic variation of envelope (*env*) gene, 2) CCR5 tropism that is important in the infection spread and progress of pathogenesis from initial infection, 3) Subtype C virus which is most popular subtype in the world and different from well analyzed subtype B in the neutralization profile. Therefore, we generated a new monkey-tropic HIV-1 carrying *env* from a CCR5-tropic subtype C HIV-1 clinical isolate. Using intracellular homologous recombination, we generated an uncloned chimeric virus consisting of at least seven types of recombination breakpoints in the region between *vpr* and *env*. The virus increased its replication capacity while maintaining CCR5 tropism after *in vitro* passage in PtM primary lymphocytes. PtM infection with the adapted virus exhibited high peak viremia levels in plasma while the virus was undetectable at 12 - 16 weeks. This virus serves as starting point for generating a pathogenic monkey-tropic HIV-1 with CCR5-tropic subtype C *env*, perhaps through serial passage in macaques.

2) Development of a novel dengue-1 virus replicon system expressing secretory Gaussia luciferase for analysis of viral replication and discovery of antiviral drugs: F. KATO, T. KOBAYASHI, S. TAJIMA, T. TAKASAKI, T. MIURA, T. IGARASHI, and T. HISHIKI

The dengue virus spreads around tropical zone, subtropical zone area, and it is estimated that approximately 100 million people a year are infected. Though it becomes the big problem in public sanitation, an anti-viral drug and the vaccine are not yet put to practical use. One of the reasons includes that a tool to use it for anti-viral drug development and analysis of the virology is insufficient. Therefore we built a new tool called the reporter subgenomic replicon by full use of gene-recombination technology. This system can be treated safely because some viral genes in the structure domain necessary for the formation of the virus particle is deleted and any virus particles are not formed. In addition, since a secretion type reporter gene was inserted in substitution for the structure domain, intracellular virus reproduction can be analyzed easily and quickly with reporter activity in a culture supernatant as an index.

List of Publications

Otsuki, H., Yoneda, M., Igarashi, T., and Miura, T. (2014) Generation of a monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1 carrying *env* from a CCR5-tropic subtype C clinical isolate. **Virology** 460-461, 1-10.

Kato F., Kobayashi T., Tajima S., Takasaki T., Miura T., Igarashi T., and Hishiki T. (2014) Development of a novel dengue-1 virus replicon system expressing secretory Gaussia luciferase for analysis of viral replication and discovery of antiviral drugs. **Jpn. J. Infect. Dis.** 67, 209-212.

Nomaguchi, M., Nakayama, E. E., Yokoyama, M., Doi, N., Igarashi, T., Shioda, T., Sato, H. and Adachi, A. (2014) Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5alpha. **Microbes Infect.** 16, 936-944.

Adach, A. and Miura, T. (2014) Animal model studies on viral infections. **Frontiers in Microbiology**, 5, Article 672.

Hishiki, T., Han, Q., Arimoto, K., Shimotohno, K., Igarashi, T., Vasudevan, S., Suzuki, Y., and Yamamoto, N. (2014) Interferon-mediated ISG15 conjugation restricts dengue virus 2 replication. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 448, 95-100.

Arimoto, K., Hishiki, T., Kiyonari, H., Abe, T., Cheng, C., Yan, M., Fan, J., Futakuchi, M., Tsuda, H., Murakami, Y., Suzuki, H., Zhang, D., and Shimotohno, K. (2014) Murine Herc6 plays a critical role in protein ISGylation *in vivo* and has an ISGylation independent function in seminal vesicles. **J Interferon Cytokine Res.** in press.

Saito A, Matsuoka K, Ode H, Otsuki H, Yoshida T, Iwatani Y, Sugiura W, Matano, T, Miura, T, Akari H A novel HIV-1mt encoding CCR5-tropic Env established persistent infection in Cynomolgus macaques. 2014 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, March 3-6 2014.

日紫喜隆行、加藤文博、田島茂、高崎智彦、三浦智行、五十嵐樹彦：分泌型ルシフェラーゼを有するデングウイルス1型レプリコンの構築、第49回日本脳炎ウイルス生態学研究会、山口、2014年5月16-17日

加藤文博、日紫喜隆行、大石真也、藤井信孝、三浦智行、五十嵐樹彦：抗デングウイルス化合物の

スクリーニングと作用機序の解析、第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、山口、2014 年 5 月 16-17 日

米田舞、大附寛幸、松下修三、日紫喜隆行、五十嵐樹彦、三浦智行：新規 CCR5 指向性サルヒト免疫不全ウイルスのサルへの順化における env 遺伝子変異と中和抗体抵抗性の解析、日本動物遺伝育種学会第 15 回大会、和光、2014 年 10 月 31 日 -11 月 1 日

加藤文博、三浦智行、五十嵐樹彦、日紫喜隆行：非ヒト霊長類 PBMC におけるデングウイルス増殖能の比較、第 21 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、横浜、2014 年 11 月 9 日

三浦智行、米田舞、大附寛幸、松下修三、日紫喜隆行、五十嵐樹彦：新規 CCR5 指向性 SHIV のサルへの順化と中和抗体抵抗性の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

加藤文博、石田裕樹、大石真也、藤井信孝、三浦智行、五十嵐樹彦、日紫喜 隆行：bromocriptine による抗デングウイルス活性機構の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

日紫喜隆行、加藤文博、三浦智行、五十嵐樹彦：抗デングウイルス活性を有する生薬由来成分の探索と性状解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

渡部祐司、岩見真吾、森ひろみ、松浦嘉奈子、石田裕樹、日紫喜隆行、三浦智行、五十嵐樹彦：高病原性 SHIV 感染サルにおける感染マクロファージは感染リンパ球と同程度の半減期を示す、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

芳田剛、齋藤暁、松岡和弘、大出裕高、岩谷靖雅、杉浦互、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：サル個体におけるサル指向性 HIV-1 の増殖効率を上昇させる要因、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

関紗由里、野村拓志、西澤雅子、横山勝、佐藤裕徳、團塚愛、三浦智行、小柳義夫、俣野哲朗：SIV の持続感染・伝播における変異蓄積に関する研究、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

中村碧、高原悠佑、松岡佐織、三浦智行、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗：抗 HIV 薬投与下の治療ワクチン接種により誘導される CD8 陽性 T 細胞の SIV 複製抑制能の解析、第 28 回日本エイズ学会学術集会、大阪、2014 年 12 月 3-5 日

准教授	三浦智行
助教	日紫喜隆行
博士研究員	加藤文博
技術補佐員	森ひろみ、松浦嘉奈子
大学院生	渡部祐司、石田裕樹

2014 年 3 月に大附寛幸と加藤文博が医学研究科博士課程を、日向亮輔が人間環境学研究科博士課程を、米田舞が人間環境学研究科修士課程をそれぞれ修了した。4 月には加藤文博が博士研究員として、松浦嘉奈子が技術補佐員として研究室のメンバーに加わった。また、西山由利子と原大樹が他の研究室に移籍した。同年 8 月に技術補佐員の辻桃子が退職した。同年 10 月に五十嵐樹彦教授が任期満了となった。

当研究室ではレトロウイルス（HIV, SIV, SHIV）、フラビウイルス（DENV, TBEV）およびアルテリウイルス（PRRSV）の感染を分子・培養細胞・感染個体レベルで総合的に解析することにより、これらウイルスの病原性を解明し、ウイルス疾患の治療と予防法を開発することを目的としている。2014 年の代表的な研究進展状況は、以下のとおりである。

1. CCR5 指向性のサブタイプ C 臨床分離株の *env* 遺伝子を持つサル感染性ヒト免疫不全ウイルスの構築

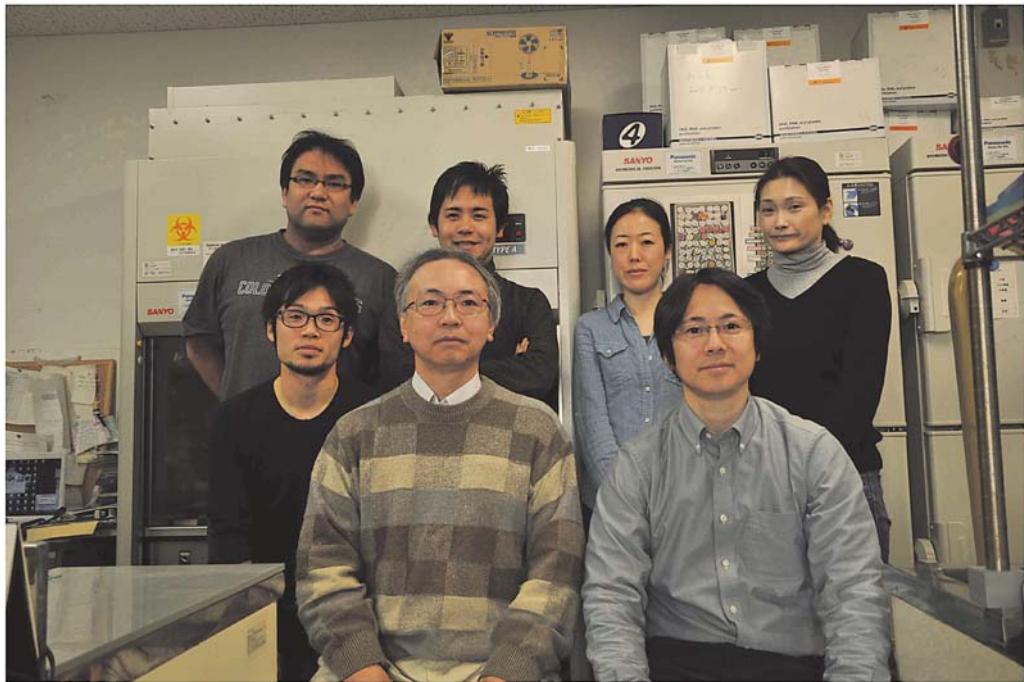
サル AIDS モデル開発において、サル指向性 HIV-1 (HIV-1mt) は従来用いられてきた SIV や SHIV に代わる新たなチャレンジウイルスとして期待される。我々は、より HIV-1 臨床分離株の感染を再現できる HIV-1mt を開発するために、1) エンベロープ (*env*) が多様性を有すること、2) 感染伝播と初期感染からの病態進行において重要な CCR5 指向性であること、3) サブタイプ B とは中和プロファイルの異なるサブタイプ C ウイルスを用いたサル AIDS モデル開発が重要と考えた。以上より、本研究では CCR5 指向性サブタイプ C *env* を持つ新規 HIV-1mt を作出し、ブタオザルへの感染性を評価した。CXCR4 指向性 HIV-1mt NL-DT5R 株のゲノムから *env* コード領域下流を欠損した DNA 断片を PCR 増幅した。同様に CCR5 指向性サブタイプ C HIV-1 臨床分離株のゲノムから 5' -LTR 領域と、*vpr* から 3' -LTR までの領域を PCR 増幅した。これら 3 つの DNA 断片を用いて細胞内相同組換えにより CCR5 指向性サブタイプ C *env* を持つ新規 HIV-1mt を作製した。このウイルスをブタ

オザル末梢血単核球（PBMC）に順化させることで複製能の向上を行い、順化後のウイルスに対して単一ゲノム増幅による遺伝子解析と阻害剤試験によるコレセプター指向性の評価を行った。さらに得られたウイルスを2頭のブタオザルに静脈内接種し、血漿ウイルス RNA 量を定量してサルへの感染性を評価した。作製したウイルスは **swarm** であり、少なくとも7パターンの組換え **breakpoint** が観察され、*env* は親株の多様性を反映した。順化後のウイルスは CCR5 指向性を保持しており、NL-DT5R と比較してブタオザル PBMC における複製能が著しく向上していた。このウイルスは順化前と異なり、1 種類の組換えパターンが **dominant** であった。さらに、2 頭のブタオザル感染において、 1.0×10^6 copies/ml 以上の高い複製ピークの血中ウイルス量が観察され、1 頭は感染 9 週間まで 1.0×10^4 copies/ml 以上を維持した。ブタオザル細胞への順化の過程で、変異の蓄積とウイルス同士の組換えにより、より効率的に複製するウイルスが選択されたと考えられる。個体感染においてさらに変異が導入された可能性は高く、このウイルスの遺伝子解析から、より複製能が高く、持続感染可能な HIV-1mt を開発するうえで有用な情報が得られると期待される。(Otsuki, H. et al. Virology 460-461: 1-10, 2014)

2. レポーターサブゲノムレプリコンの構築

デングウイルスは熱帯・亜熱帯地域を中心に蔓延しており、年間約1億人が感染していると推定されている。公衆衛生上大きな問題となっているにもかかわらず、抗ウイルス薬やワクチンは未だ実用化されていない。その理由の一つに抗ウイルス薬開発や、ウイルス学的解析に用いるためのツールが不足していることが挙げられる。

そこで我々は、遺伝子組み換え技術を駆使し、レポーターサブゲノムレプリコンという新たなツールを構築した。この系は、ウイルス粒子の形成に必要なウイルス遺伝子（構造領域）を欠失させていることからウイルス粒子が形成されず、安全に扱う事が出来る。また、構造領域の代わりに分泌型レポーター遺伝子を挿入した事によって、細胞内のウイルス複製を培養上清中のレポーター活性を指標に簡便かつ迅速に解析することが可能となった。(Kato, F. et al. Jpn J Infect Dis, 67: 209-212, 2014.)



Laboratory of Evolutional Virology

Members

Professor	Hirofumi Akari
Assistant Professor	Takeshi Yoshida
	Amane Kogure
Postdoctoral Fellow	Atsunori Higashino
	Yohei Seki
Graduate Student	Saori Suzuki
Technical Assistant	Natsumi Tamura

Introduction

This laboratory is newly established in 2013 for active and effective collaboration between Institute for Virus Research and Primate Research Institute of Kyoto University. We are interested in the co-evolution between hosts and intractable viruses. Viral infection to a new host may lead to small but life-or-death war, while in due course they could finally compromise and live together (symbiosis). Probably, each battle between viruses and hosts should include a variety of long and exciting story, for example, hosts seek to control viral invasion by innate and acquired immunity and then viruses try to develop new weapon to evade the immunity. Unfortunately, this endless chicken race may accidentally cause viral acquisition of life-threatening pathogenicity to the hosts. Exploring cellular and molecular machinery for the co-evolution will provide us precious hints to survive, either win against viruses or live together. With this in mind, we are investigating the mechanisms for the viral persistency and pathogenesis of intractable viruses, HIV and HCV, by employing non-human primate models for the viral infection.

Topics

1) Contributing factor to facilitate viral growth of macaque-tropic HIV-1 *in vivo*: T. YOSHIDA, Y. SEKI and H. AKARI

Macaque monkeys serve as important animal models for understanding the pathogenesis of lentiviral infections. Since human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) hardly replicates in macaque cells, the development of a macaque-tropic HIV-1 (HIV-1mt) having the ability to replicate efficiently in macaques has long been desired. In addition, since HIV-1 in human population usually uses C-C chemokine receptor type 5

(CCR5) as a co-receptor during transmission, it will be straightforward to develop an R5-tropic HIV-1mt in order to reproduce the transmission, latency, and pathogenicity of HIV-1 in macaques. Therefore, we constructed a new R5-tropic HIV-1mt named SA38 having the *env* gene of MK38, which is the R5-tropic chimeric viruses between HIV-1 and simian immunodeficiency virus (SIV) (SHIV), on the background of MN4Rh3, which is the X4-tropic HIV-1mt. Furthermore, we performed a serial *in vivo* passage of SA38 in the cynomolgus monkey in order to increase the proliferation efficiency. Subsequently, we analyzed the mutation of viral genomes to determine that the amino acid was involved in facilitating viral growth using next-generation sequencing. The results indicated that characteristic amino acid substitutions were observed in Vif, Nef, MA, p6, RT, and, Tat. Notably, it has no reports so far that deletion of 15-base pair DNA sequences found in the *vif* gene.

2) Genome mutations of persistently infected Hepacivirus which is related to hepatitis-C in primates: A. HIGASHINO, S. SUZUKI and H. AKARI

Our laboratory has reported that two common marmosets infected with GBV-B derived from a molecular clone pGBB developed long-term persistent infection among four common marmosets. GBV-B infection produces a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. However, it is still unclear how virus mutations relate to disease progression in hepatitis C. In this study, we analyzed the viral genome sequence between acute clearance and persistent infection. We were able to analyze GBV-B adaptive or escape mutations for persistent infection. Many mutations were located in NS5A, NS5B regions on the GBV-B, which might cause long-term persistent infection or liver fibrosis. It is known that NS5A involve IFN resistance by inhibiting ISG expression pathway. NS5A may have had diversity in order to inhibit anti-virus factors. Since it has reported that NS5B is RNA depend RNA polymerase in HCV, mutations observed in this region seem to increase the efficiency of replication of the viral RNA. Our studies revealed that the mutations on GBV-B derived from infectious clone.

3) HCV based chimeric virus of which envelope is derived from GBV-B infects tamarin persistently: S. SUZUKI, A. HIGASHINO and H. AKARI

Majority of Hepatitis C virus (HCV) infected-patients suffer from liver pathologies including fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. But development of vaccines has been hampered by the lack of appropriate animal models. GBV-B is closely related to HCV genetically and GBV-B-infected red-handed tamarins (*Saguinus midas*) and common marmosets (*Callithrix jacchus*) show similar symptom with HCV infection. In this study, we report that a tamarin infected with HCV/GBV-B chimeric virus (HCV/GB) containing GBV-B structural genes coding for envelope proteins (core-p6) substituted for the counterparts of HCV. And marmosets infected with GBV-B/HCV chimeric virus (GBV-B/HCV-1, 2) containing HCV genes coding for either envelope proteins (core-E2) or proteins (5' UTR-E2) substituted for the counterparts of

GBV-B respectively. HCV/GB infected tamarin persisted chronic infection for over three years but GBV-B/HC-1, 2 caused acute infection and were excluded in marmosets. This is the first report demonstrating that HCV based chimeric virus caused chronic infection in New World Monkeys. This primate model has a possibility that it could evaluate efficacy of new vaccine candidates against HCV in the future.

4) Analysis of antiviral innate immune responses induced by Influenza A virus infection: A. KOGURE

Influenza A virus encodes non-structural protein 1 (NS1) to counteract host immune responses. Especially NS1 strongly inhibits interferon production by the host. However it has been controversial concerning molecular mechanism of the inhibition. NS1 is a critical viral factor for viral survival. Our preliminary results suggest that NS1 has multiple targets to facilitate its replication.

List of Publications

Fujie, Y., Fusaki, N., Katayama, T., Hamasaki, M., Soejima, Y., Soga, M., Ban, H., Hasegawa, M., Yamashita, S., Kimura, S., et al. (2014). New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. **PloS one** 9, e113052.

Suzuki, S., Konnai, S., Okagawa, T., Ikebuchi, R., Nishimori, A., Kohara, J., Mingala, C.N., Murata, S., and Ohashi, K. (2014). Increased expression of the regulatory T cell-associated marker CTLA-4 in bovine leukemia virus infection. **Veterinary immunology and immunopathology** 163, 115-124.

Yoshida, T., Koyanagi, Y., Akari, H., and Strebel, K.: HIV-1 Vpu Antagonizes Rhesus Macaque and Chimpanzee BST-2 Through Cytoplasmic Domain Interactions, CROI 2014, Boston, USA, 3-6 March, 2014.

鈴木紗織、東濃篤徳、森健一、片貝祐子、齊藤暁、榎昇、明里宏文：GBV-B 感染マーモセット / タマリンにおける慢性化移行には液性免疫応答の遅延が関与する、第 61 回日本実験動物学会総会、札幌、2014 年 5 月 17 日

東濃篤徳、鈴木紗織、齊藤暁、松岡和弘、大出裕高、片貝祐子、岡林佐知、森健一、榎昇、明里宏文：小型霊長類モデルを用いたヘパチウイルスの持続感染における慢性肝炎発症に影響するウイルスゲノム変異解析、第 61 回日本実験動物学会総会、札幌、2014 年 5 月 17 日

東濃篤徳、鈴木紗織、森健一、大出裕高、松岡和弘、片貝祐子、岡林佐知、榎昇、岩谷靖雅、杉浦

互、明里宏文：小型霊長類において持続感染した GBV-B の変異解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10 日

芳田剛、齊藤暁、松岡和弘、大出裕高、岩谷靖雅、杉浦互、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：サル個体におけるサル指向性 HIV-1 の増殖効率を上昇させる要因、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 11 日

芳田剛、齊藤暁、松岡和弘、大出裕高、岩谷靖雅、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、杉浦互、明里宏文：サル指向性 HIV-1 の感染個体における増殖効率を上昇させる要因、第 28 回日本エイズ学会学術集会、大阪、2014 年 12 月 3 日

教授	明里宏文
助教	芳田 剛
	木檜 周
研究員	東濃篤徳
	関 洋平
大学院生	鈴木紗織
技術補佐員	田村夏海

当研究室には、平成 26 年 10 月から公益財団法人エイズ予防財団リサーチ・レジデントの関洋平、および、技術補佐員の田村夏海が新たに加わった。また、当研究室は、京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センターの所属であるが、ウイルス研究所と霊長類研究所の共同事業として新たに新興ウイルス感染症の起源と機序を探ることを目的に設置された「進化ウイルス研究領域」を兼務することとなり、平成 26 年 7 月より本事業推進のため研究拠点をウイルス研究所へ移設した。

当研究室では、霊長類モデルを用いて難治性ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス（HIV）および C 型肝炎ウイルス（HCV）の病原性や持続感染の原因を明らかにすることを目指し、主に以下の 3 つのテーマについて研究を遂行している。

1) サル指向性 HIV-1 の *in vivo* における増殖効率を上昇させる要因の解明

ヒト免疫不全ウイルス 1 型（HIV-1）はカニクイザルなどのマカク属では増殖しないため、HIV-1 感染を再現できる実用的な霊長類モデルが長年求められてきた。近年、サル細胞において HIV-1 増殖に抑制的に働く宿主因子の解析が進み、これらの知見を基に、サルで増殖可能なサル指向性 HIV-1（HIV-1mt）が構築された。その際、ヒトの HIV-1 感染において感染伝播に重要である CCR5 指向性ウイルスの *env* を持つ HIV-1mt を樹立することにより、感染者の病態をより反映したモデルとなることが予想される。このモデル系を、新たな HIV 制御法の確立およびその前臨床評価のための病態解析システムとして活用できるように整備することを目的としている。そこで、これまで使用していた CXCR4 指向性 HIV-1mt（MN4Rh-3）の *env* 領域を、CCR5 指向性病原性 SHIV（MK38 株）由来の *env* へ置換することにより、CCR5 指向性ウイルスへと変換した。新たに樹立した CCR5 指向性 HIV-1mt（AS38 株）をカニクイザルに感染させ、さらに個体間継代を行った。その結果、個体間

継代を重ねるたびに、接種ウイルス量を減少させているにもかかわらず、個体間継代 3 代目の個体において急性感染期の血中ウイルス RNA 量が約 30 倍に上昇した。そのため、個体間継代により感染個体におけるウイルスの増殖効率が飛躍的に改善されたと考えられる。さらに、ウイルス増殖促進の決定要因を明らかにするため、感染ザルから得たウイルスゲノムについて次世代シーケンス法を用いて解析を行った。その結果、Vif、Nef、MA、p6、RT、Tat において特徴的なアミノ酸置換変異が認められた。とりわけ、vif 遺伝子に生じた 15 塩基の欠失はこれまでに報告のない変異であった。

2) 小型霊長類において持続感染したヘパチウイルスゲノムの経時的変異

GBV-B は小型霊長類に感染し C 型肝炎様症状を呈するヘパチウイルスであり、C 型肝炎ウイルス (HCV) に近縁なウイルスとして知られている。これまでに小型霊長類に GBV-B を接種することで感染は成立するが急性クリアランスが起こることが数多く報告されている。一方で数は少ないながらも複数年の長期に渡り持続感染することも報告されている。この GBV-B 感染モデルが本当に HCV 感染モデルになりうるのか、病態モデルとしての位置づけを明らかにするために我々が行ってきた感染実験データを解析するとともに、HCV の病態進行の機序を探るために GBV-B の経時的変異解析を行った。新世界ザルへの感染性クローン由来 GBV-B の接種により急性クリアランスした群 (Acute Clearance, AC 群)・持続感染した群 (Persistent Infection, PI 群)・長期持続感染または肝線維化した群 (Disease Progression, DP 群) が観察された。持続感染は約 1 割の確率で観察された。多数観察された AC 群は感染後 1 年くらいの感染初期モデルとして有用であると思われる。GBV-B は感染により C 型肝炎病態に類似した 2 つのステージに分けることができることから、HCV に類似した病原性を有することが示唆された。次に経時採血された血漿中 GBV-B のシーケンスデータからアミノ酸変異を解析した。その結果、免疫回避に関与すると思われる復帰・連続変異、および宿主適応に関与すると思われる持続変異が見つかり、持続感染個体での GBV-B は宿主免疫から逃れるために変異し続けていることが示唆された。また複数個体で見られた持続変異は、ほぼ同時期に獲得していることが確認されたことから、GBV-B は病態ステージにあわせて宿主に適応していることが示唆された。これらの結果から、GBV-B 感染には獲得免疫から回避するとともに自然免疫を抑制し、初期には RNA ポリメラーゼの変異、後期には Membranous web 構成タンパク質の変異によって安定した複製増殖が重要であることが示唆された。今後、PI 群、DP 群で確認された変異が実際に感染の長期化・病態進行に関わるか否か変異ウイルスを作製し、その感染性等を評価する必要がある。

た。この結果からエンベロープのみ GBV-B 由来で HCV ベースのキメラウイルスが新世界ザルに感染したことが初めて明らかになった。また GBV/HC-1 や GBV/HC-2 が持続感染しなかったことから、新世界ザルへの HCV/GBV-B キメラウイルス持続感染には GBV-B のエンベロープが重要であり、HCV の非構造タンパク質でもサル個体内で代替可能であることが示唆された。今後はこのキメラウイルスをさらに改良し肝炎病態を引き起す霊長類モデルを確立したい。

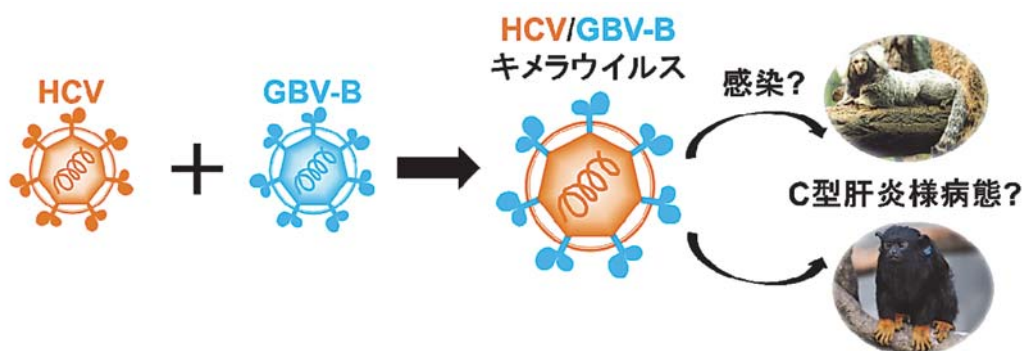


図 2. キメラウイルスによる C 型肝炎霊長類モデルの構築

4) インフルエンザ A ウイルス感染によって誘導される自然免疫応答の解析

インフルエンザ A ウイルスは免疫抑制活性のある非構造蛋白質 NS1 をコードしており、そのためにインターフェロン産生などの自然免疫応答を抑制する事でその存続を図っている。しかしながら、NS1 の作用点については異論があり、複数の標的分子が存在する事が示唆されている。インフルエンザウイルスと自然免疫応答に関して解析を行なっている（担当：木曾）。

Center for Emerging Virus Research

I. First Group

Members

Assistant Professor (Spe.) Yohei Hizukuri

Introduction

The cell surface of bacteria is always exposed to and threatened by a variety of stresses caused by the fluctuation of environmental conditions, and the maintenance of its functions is critical for cell viability. The extracytoplasmic stress response (ESR) plays key roles to cope with these cell surface stresses and are important for bacterial survival strategy. ESR is thought to be one of the major systems of virulent bacteria, for example *Salmonella* Spp., to resist host defense systems triggered by bacterial infection or invasion. Thus understanding of the whole picture of ESR is an important issue from a medical point of view. This research group focuses on and aims to clarify the mechanism and physiological roles of the σ^E -dependent ESR, one of the major ESR pathways in *Escherichia coli*.

In the σ^E -pathway ESR, cell envelope stresses such as accumulation of malformed outer membrane proteins (OMPs) or lipopolysaccharides (LPSs) trigger sequential cleavages of RseA, a membrane-spanning anti- σ^E protein that inhibits the σ^E activity under non-stressed conditions. The stress cues activate a membrane-anchored protease DegS to cleave RseA, which is followed by the second cleavage by an intramembrane-cleaving protease RseP. After the two-step cleavage events, the complex of the cytoplasmic fragment of RseA and σ^E is liberated from the membrane to the cytoplasmic space, leading to degradation of the RseA fragment and eventual activation of σ^E . RseP cleaves RseA only after DegS truncated the periplasmic part of RseA, which makes the activation of σ^E highly dependent on DegS-mediated sensing of stress signals. In the σ^E -pathway ESR, an extracellular stress signal is transduced into the cell interior across the cell membrane through these two-step proteolysis of RseA.

Topics

Visualization and dynamic analysis of an extracytoplasmic stress response in living bacterial cells: Y. HIZUKURI and Y. AKIYAMA

We are interested in the σ^E -pathway ESR as a complicated and exquisitely regulated signal transduction system. We hope to understand this dynamic cellular process that occurred around the membrane through fluorescent microscopic observation of the related factors and single cell imaging analysis. We constructed derivatives of an essential key regulator RseP and its proteolytic substrate RseA that have a fluorescent

protein (*e.g.* GFP) moiety. Now we are attempting to observe these fusion proteins in living cells by using a fluorescent microscope and to visualize alteration of intracellular localization of these components in response to various extracellular stress signals.

List of Publications

Hizukuri, Y., Oda, T., Tabata, S., Tamura-Kawakami, K., Oi, R., Sato, M., Takagi, J., Akiyama, Y., and Nogi, T. (2014) A structure-based model of substrate discrimination by a non-canonical PDZ tandem in the intramembrane-cleaving protease RseP. **Structure** 22, 326-336.

Hizukuri, Y., Oda, T., Tabata, S., Tamura-Kawakami, K., Oi, R., Sato, M., Takagi, J., Akiyama, Y., and Nogi, T.: "Substrate discrimination by size-exclusion in the intramembrane protease RseP", IUCr 2014 - 23rd Congress and General Assembly, Montreal, Canada, 5-12 August, 2014.

檜作洋平、秋山芳展：膜内切断プロテアーゼ RseP による大腸菌 σ^E 経路表層ストレス応答の制御機構、2013 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの細胞構築・運動・増殖機構の研究」、三島、2014 年 3 月 25-26 日

秋山光市郎、水野慎也、檜作洋平、禾 晃和、森 博幸、秋山芳展：S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP の膜内挿入ループ領域の機能解析、第 11 回 21 世紀大腸菌研究会、盛岡、2014 年 6 月 5-6 日

秋山光市郎、水野慎也、檜作洋平、禾 晃和、森 博幸、秋山芳展：大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の保存された膜内挿入ループ領域の機能解析、第 14 回日本蛋白質科学会年会、横浜、2014 年 6 月 25-27 日

檜作洋平、小田 隆、田畑早苗、川上 - 田村恵子、大井里香、佐藤 衛、高木淳一、禾 晃和、秋山芳展：細菌表層ストレス応答制御に関わる膜内切断プロテアーゼ RseP のタンデム PDZ ドメインによる切断基質選別機構の解析、第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月 15-18 日

II. Second Group

Members

Assistant Professor (Spe.) Akiko Makino

Topics

Borna disease virus possesses an NF- κ B inhibitory sequence in the nucleoprotein gene: MAKINO, A., FUJINO, K., PARRISH, N. F., HONDA, T., and TOMONAGA, K.

Borna disease virus (BDV), which has broad host range in vertebrates, causes persistent infection in nucleus of neural cells that can lead to neural disorder in horses and sheep. Previous study has shown that constitutive activation of NF- κ B suppresses the BDV growth, however, NF- κ B pathway is not activated in the acute infection of BDV. To elucidate mechanism for the inhibition of NF- κ B activation by BDV infection, we evaluated cross-talk between BDV infection and NF- κ B pathway.

Using Multiple EM for Motif Elicitation analysis, we found that the nucleoproteins of BDV (BDV-N) and NF- κ B1, which is one of the NF- κ B family and has a transcription factor activity by processing of precursor p105 form, share a common ankyrin-like motif. When THP1-CD14 cells were pre-treated with the identified peptide, NF- κ B activation by Toll-like receptor ligands was suppressed. The 20S proteasome assay showed that BDV-N and BDV-N-derived peptide inhibited the processing of NF- κ B1 p105 into p50. Furthermore, immunoprecipitation assays showed that BDV-N interacted with NF- κ B1 but not with NF- κ B2, which shares no common motif with BDV-N. These results suggest BDV-N inhibits NF- κ B1 processing by the 20S proteasome through its ankyrin-like peptide sequence, resulting in the suppression of NF- κ B pathway activation. This inhibitory effect of BDV on the induction of the host innate immunity might provide benefits against persistent BDV infection.

List of Publications

Akiko Makino: “Development of borna disease virus vector system” Special seminar at Mayo clinic, 24 July, 2014.

Akiko Makino, Kan Fujino, Takuji Daito, Tomoyuki Honda, Keizo Tomonaga: “Expression of IGF2 affects Borna disease virus production in infected cells” International Union of Microbiological Societies Congresses, Montreal, Canada, 27 July – 1 August, 2014.

牧野晶子、藤野寛、大東卓史、本田知之、朝長啓造：ボルナウイルスの粒子産生制御機構の解析．
第3回 Negative Strand Virus-Japan、沖縄、2014年1月13-15日

牧野晶子、宮沢孝幸、鈴木善幸、三浦恭子、朝長啓造：ハダカデバネズミのゲノムに内在化したレトロウイルス様配列の解析、第157回日本獣医学会学術集会、札幌、2014年9月9日-12日

牧野晶子、藤野寛、平井悠哉、惣福梢、本田知之、朝長啓造：ボルナ病ウイルス粒子産生に対する宿主因子 IGF2 の関与、第62回日本ウイルス学会、横浜、2014年11月10日-12日

I. First Group

特定助教

檜作洋平

1) 細菌表層ストレス応答の生細胞内可視化とそのダイナミクス解析

細菌は単細胞生物であるためにわずかな外部環境の変化の影響を強く受け、それはしばしば致命的となります。そのような細胞表層ストレスに対処するための「表層ストレス応答」機構は細菌の生存戦略において重要であると考えられます。表層ストレス応答は、例えばサルモネラ菌などの病原性細菌が、宿主生物に感染・侵入した際の防御応答に対抗するための主要な機構の1つでもあり、その解明は医学的にも重要な意味を持ちます。

大腸菌では5種の表層ストレス応答経路が見出されており、そのうちの主要な経路の1つである σ^E 経路表層ストレス応答では、熱やアルカリなどの細胞外ストレスにより生じた変性外膜タンパク質 (OMP) 等の蓄積がストレス応答のトリガーとなります (図1)。膜結合型プロテアーゼである DegS は変性した OMP を感知して活性化され、膜貫通型アンチ σ^E タンパク質 RseA を膜直上で切断します。細胞質外領域を切除された RseA 切断中間体は引き続き膜内切断プロテアーゼである RseP により脂質二重層内部で切断を受け、最終的に膜から遊離した RseA 細胞質領域が分解されることでストレス応答転写因子 σ^E がリリースされ、活性化されることでストレス応答因子群の発現が誘導されます。このような巧妙な RseA の二段階切断反応によって細胞外のシグナルが生体膜を越えて細胞内へと伝達されます。私たちはこのような生体膜近傍で起こる複雑なシグナル伝達イベントに着目し、関連因子群の蛍光顕微鏡観察による細胞内可視化によって細胞外ストレスに対するダイナミックな細胞応答を理解したいと考えています。現在、ストレス応答経路において必須の因子である RseP やその切断基質となる RseA に GFP 等の蛍光タンパク質を融合させた派生体を作製し、生細胞中での蛍光観察と細胞外ストレスに応じた蛍光局在変化の可視化に取り組んでいます。

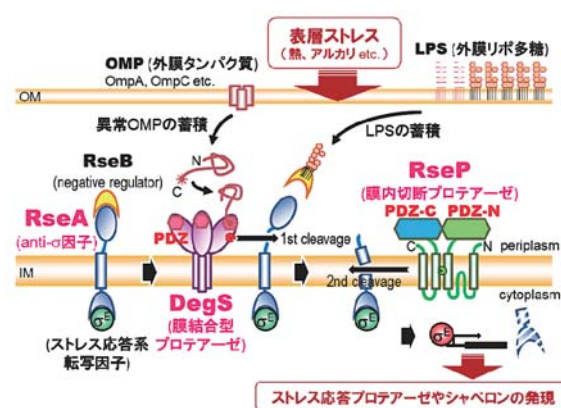


図1. 大腸菌の σ^E 経路表層ストレス応答

II. Second Group

特定助教

牧野晶子

1) ボルナ病ウイルスは N 遺伝子に NF- κ B 活性化の抑制配列を持つ

ボルナ病ウイルス (BDV) は脊椎動物に広く宿主域を持ち、神経細胞の核に持続感染しウマや羊に神経疾患を引き起こす。従来 NF- κ B を恒常的に活性化した細胞では BDV の増殖は抑制されるが、NF- κ B 経路は BDV の急性感染では活性化されないことが報告されている。この BDV 感染による NF- κ B 活性化の抑制メカニズムを明らかにするため、本研究では BDV と NF- κ B 経路のクロストークを評価した。

MEME 解析により、BDV の N 遺伝子と NF- κ B ファミリーの一つで p105 がプロセッシングを受けることで転写因子活性を持つ NF- κ B1 が、共通するアンキリン様モチーフを持つことが示唆された。この同定したモチーフ配列を持つペプチドで THP1-CD14 細胞を前処理すると、TLR リガンド刺激による NF- κ B 経路の活性化が抑制された。また 20S プロテアソームによる NF- κ B1 の p105 から p50 へのプロセッシングは、BDV-N タンパク質および同定したモチーフ配列を持つペプチドにより抑制された。さらに BDV-N はモチーフを共有する NF- κ B1 と相互作用することが示唆されたがモチーフを持たない NF- κ B2 とは共免疫沈降しなかった。これらのことから BDV-N はそのアンキリン様配列を介して 20S プロテアソームによる NF- κ B1 のプロセッシングを阻害することで NF- κ B 経路の活性化を抑制していることが示唆された。BDV は宿主の自然免疫の誘導を抑制することで持続感染に有利な環境を作り出していると考えられた。

上述の研究成果及び BDV の粒子産生制御に関わる宿主因子の研究成果などの報告として、1 月には Negative Strand Virus-Japan で口頭発表、7 月に米国メイヨークリニックにて招待講演、また 7 月から 8 月にかけて開催された International Union of Microbiological Societies Congresses にてポスター発表、9 月に日本獣医学会にて口頭発表、11 月には日本ウイルス学会にて口頭発表をおこなった。

Reproductive Engineering Team

Members

Technical Specialist

Hitoshi Miyachi

Technical Staff

Satsuki Kitano (Konaka)

Introduction

Reproductive engineering team is a support unit for generating transgenic mouse (Tg) and knockout mouse (KO) under the animal committee of our institute. We also perform cryopreservation of mouse fertilized eggs. Current staffs are Kitano and Miyachi. Results of last three years are as follows.

1) Freezing embryos

2012	140 strains	32,836 embryos
2013	198 strains	52,272 embryos
2014	194 strains	85,005 embryos

2) Transgenic mouse production with cloned DNAs

	No of constructs	No of embryos injected	No of transgenic pups obtained
2012	77	31,452	176(0.6%)
2013	71	27,924	67(0.2%)
2014	37	18,236	142(0.8%)

3) Production of chimeric mouse

	No of ES clones injected	No of embryos chimera obtained	No of coatcolor
2012	63	5,145	192(3.7%)
2013	70	5,510	129(2.3%)
2014	23	2,442	82(3.6%)

4) CRISPR/Cas9

	No of constructs	No of embryos	No of genome edited mouse
2013	18	6,301	66(1.05%)
2014	32	14,839	47(0.32%)

List of Publications

Cui, G., Hara, T., Simmons, S., Wagatsuma, K., Abe, A., Miyachi, H., Kitano, S., Ishii, M., Tani-ichi, S., and Ikuta, K. (2014). Characterization of the IL-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 1915-1920.

Dai, P., Harada, Y., Miyachi, H., Tanaka, H., Kitano, S., Adachi, T., Suzuki, T., Hino, H., and Takamatsu, T. (2014). Combining TGF-beta signal inhibition and connexin43 silencing for iPSC induction from mouse cardiomyocytes. *Sci. Rep.* *4*, 7323.

Hirai, H., Fujishita, T., Kurimoto, K., Miyachi, H., Kitano, S., Inamoto, S., Itatani, Y., Saitou, M., Maekawa, T., and Taketo, M.M. (2014). CCR1-mediated accumulation of myeloid cells in the liver microenvironment promoting mouse colon cancer metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* *31*, 977-989.

Sakamoto, M., Ieki, N., Miyoshi, G., Mochimaru, D., Miyachi, H., Imura, T., Yamaguchi, M., Fishell, G., Mori, K., Kageyama, R., and Imayoshi, I. (2014). Continuous postnatal neurogenesis contributes to formation of the olfactory bulb neural circuits and flexible olfactory associative learning. *J. Neurosci.* *34*, 5788-5799.

Makino, Y., Inoue, E., Hada, M., Aoshima, K., Kitano, S., Miyachi, H., and Okada, Y. (2014). Generation of a dual-color reporter mouse line to monitor spermatogenesis in vivo. *Front. Cell Dev. Biol.*, 23 July 2014.

技術専門職員 宮地 均
技術職員 小中（北野） さつき

マウス作製支援チームはウイルス研究所動物委員会の下でマウス受精卵の凍結保存をはじめトランスジェニックマウス（Tg）やノックアウトマウス（KO）の作製支援を行っている。また、生殖工学技術を用い、体外受精によるマウスコロニーの拡大、ホモマウス作製、胎生期解析用の受精卵準備や ICSI（顕微授精）、卵巣移植なども実施可能である。最近では CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子編集マウスの作製も実施している。詳細についてはホームページをご参照いただきたい。<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/tgkoivf/index.htm>

過去 3 年間の実績は下記の通りである。

1) 胚の凍結保存

2012 年	140 系統	32,836 個
2013 年	198 系統	52,272 個
2014 年	194 系統	85,005 個

2) トランスジェニックマウスの作製

	依頼数	使用胚数	Tg 産仔数
2012 年	77	31,452	176 (0.6%)
2013 年	71	27,924	67 (0.2%)
2014 年	37	18,236	142 (0.8%)

3) キメラマウスの作製

	クローン数	使用胚数	毛色キメラ数
2012 年	63	5,145	192 (3.7%)
2013 年	70	5,510	129 (2.3%)
2014 年	23	2,442	82 (3.6%)

4) その他

CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子編集マウスの作製

	依頼数	使用胚数	遺伝子編集マウス数
2013 年	18	6,301	66
2014 年	32	14,839	47

受精卵の個体復元	依頼数	使用胚数	仮親マウス数
2013 年	87	8,759	420
2014 年	77	7,488	358

Computer Network of Institute for Virus Research

Assistant Professor

Keiko Takemoto

Institute for Virus Research LAN system (IVR-LAN) has administrated by the network committee consisted of four staffs (Prof. Toyoshima, Prof. Akiyama, Associate Prof. Mori and Instructor Takemoto). IVR-LAN service has covered for researchers of some medical departments as well as IVR, and the primary purpose of IVR-LAN is to offer accessibility to the Internet in support of their studies. IVR-LAN has provided a variety of network services, including E-Mail, WEB-mail, WWW, File-sharing, online reservation of seminar rooms, SSH and all Outgoing TCP services except for P2P. Main services are working on Linux workstations.

This year computer room has moved to a different floor because of the project to renovate the library rooms, which are neighboring of the computer room. After the renovation, we will install a high-memory server for bioinformatics, specifically for doing Next Generation Sequencing (NGS) data analysis. At the same time, we maintain our network services and the exclusive services such as a licence management of genetic analysis tool.

However IVR-LAN has adequately equipped, we must have a responsibility for sending/getting data. A few accidents have occurred in this year. IVR-LAN users need to get certifications of training of e-learning course which is provided by Institute for Information Management and Communication of Kyoto university.

In addition to the administration of network, Takemoto has studied the epigenetic regulation of mouse endogenous retroviruses during cell differentiation. Conditional knockdown mice of histone methyltransferase ESET, and/or DNA de novo methyltransferase Dnmt1 have been analyzed with RNA-seq and ChIP-seq.

ウイルス研究所コンピューターネットワークシステム

Computer Network of Institute for Virus Research

助教

竹本経緯子

ウイルス研究所ネットワークシステムは、秋山教授、生田教授、豊島教授、竹本助教より構成されるネットワーク委員会によって管理され、ウイルス研究所、附属ゲノム医学センターおよび医学部分子医学専攻の3部局が含まれる分子生物学実験研究棟、および動物実験棟へサービスを提供している。本研究所LANは、Linuxサーバー及びウインドウズサーバ等を用いて、情報伝達の高速性・機能性・安全性を満たすサービスの提供を第一に、電子メール・WEB・ファイル・ライセンスサーバー等を運用している。

今年度はサーバー室の改装および大型の遺伝子情報解析サーバの導入が予定されている。次世代シーケンサー等の技術革新によって生み出される膨大な遺伝情報を解析し使いこなす事は、今後のウイルス学、医学、分子生物学研究にとって必須なリテラシーである。大量データを用いた情報解析等を所内の研究者が自由に行える環境を整える予定である。

ハードウェアの管理やOS・ソフトウェアの脆弱性に関して、今年度も京都大学情報環境機構の提供するNessusを用いてサーバーのぜい弱性検査を行い、設定の不備や不要なサービスをチェックした。一方、無線アクセッサーの管理はいまだ完全とは言えず、無線機器の増加に管理側が追いついていないのが現状である。個々のルーターにMACアドレス制限をかける等の徹底を今後も呼びかけてゆく必要がある。研究活動にネットワークを介した情報アクセスが欠かせないものである以上、全ユーザーの情報リテラシーの向上が望まれる。

研究所ネットワーク管理に加えて、竹本は次世代シーケンサーのデータ解析を行っている。コンピュータ室には現在、データ解析用ワークステーションが2台あり、1台にはExome解析とRNA-Seqの解析パイプラインがインストールされている。ヒト及びマウスのディープ・シーケンシングデータを用いてChIP-Seq、転写因子の結合モチーフの探索、RNA-seq、レトロエレメントのエピジェネティックな発現制御の研究等に関わっている。

SEMINARS OF THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH

Twenty-three seminars were held at the Institute for Virus Research under the auspices of the Institute in 2014. Twelve lectures were from abroad and eleven others were from Japan.

January 15	Dr. Katsumi Maenaka, Hokkaido University, Japan. “Structural basis for cell-entry machinery of morbillivirus”
January 22	Dr. So Nakagawa, Tokai University, Japan. “Genomic data decode the dynamics of biological evolution: gain-of-functions of overlapping genes and virus-derived genes”
February 7	Dr. Francois Clavel, INSERM, France. “How well has HIV-2 adapted to replication in humans?”
February 19	Dr. Bryan R. Cullen, Duke University Medical Center, US. “Retroviruses and microRNAs”
March 3	Dr. Luc Willems, University of Liège, Belgium. “Activation of transcription and stimulation of DNA replication as cancer treatments”
March 13	Dr. Nicholas Parrish, University of Pennsylvania, US. “Phenotypic Properties of Mucosally Transmitted HIV-1”
March 31	Dr. Taisuke Izumi, The University of Tokushima, Japan. “The Establishment of Laser Scanning Fluorescent Microscopy-Based Technology For High Efficiency of Single HIV-1 Virion Analysis”
April 9	Dr. Toshio Suda, Keio University, Japan “Maintenance of self-renewability of haematopoietic stem cells”
April 24	Dr. Marco Candeias, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Japan. “Synonymous p53 mutations unleash p53 oncogene”
June 10	Dr. Chou-Zen Giam, Uniformed Services University of the Health Sciences, US. “Outcomes of HTLV-1 Infection: Senescence, Latency, Reactivation, and Pathogenesis”
July 8	Dr. Tetsuya Iida, Osaka University, Japan. “Genomics and Metagenomics of Bacterial Infections”
September 3	Dr. François Guillemot, MRC National Institute for Medical Research, UK. “Factors and signals controlling stem cell activity in the adult brain”
October 17	Dr. Shinjiro Hino, Kumamoto University, Japan. “Epigenetic regulation in cellular energy expenditure”
October 21	Dr. Ekram W. Abd El- Wahab, Université de Strasbourg, France. “Specific Recognition of the HIV-1 genomic RNA by the Gag precursor”
November 20	Dr. Kenta Matsuda, National Institute of Health, US. “Establishment of primate model for

AIDS encephalopathy and analysis of its pathogenesis”

- November 28 Dr. Masaru Ishii, Osaka University, Japan. “Visualizing the migration of immune cells in the body”
- November 28 Dr. Akihiko Okayama, University of Miyazaki, Japan. “HTLV-1 infection and chronic inflammatory diseases”
- November 28 Dr. Terry Lechler, Duke University Medical Center, US. “Cytoskeletal Reorganization in the Epidermis”
- December 2 Dr. Jay A. Levy, University of California, San Francisco, US. “The CD8+ Cell Noncytotoxic Antiviral Response (CNAR) has Innate Importance”
- December 2 Dr. Dong Sung An, UCLA AIDS Institute, US. “Toward HIV cure: Anti-HIV hematopoietic stem cell based gene therapy”
- December 9 Dr. Luke O'Neill, Trinity College Dublin, Ireland. “New Frontiers in Inflammation Research”
- December 10 Dr. Tomoya Tsukazaki, Nara Institute of Science and Technology, Japan. “Structure and function of membrane protein insertase YidC”
- December 12 Dr. Yasuharu Nishimura, Kumamoto University, Japan. “Clinical studies of cancer immunotherapy”

ORGANIZATION AND STAFF

(as of December, 2014)

(Numerals in parentheses indicate year of association with the Institute)

Director	Yoshio Koyanagi, M.D., D.Med.Sc.
Deputy Director	Yoshinori Akiyama, D.Sc.
Professors Emeriti	Yoshimi Kawade, D.Sc. (1956-1988) Yorio Hinuma, M.D., D.Med.Sc. (1980-1988) Masao Hanaoka, M.D., D.Med.Sc. (1959-1989) Mutsuo Imai, D.Sc. (1965-1991) Takashi Yura, D.Sc. (1960-1993) Masakazu Hatanaka, M.D., D.Med.Sc. (1980-1995) Akinori Ishimoto, M.D., D.Med.Sc. (1964-1968, 1978-2002) Yoshiaki Ito, M.D., D.Med.Sc. (1984-2002) Masanori Hayami, D.V.M., D.Agr. (1988-2006) Koreaki Ito, D.Sc. (1971-2007) Kunitada Shimotohno, Pharm.D. (1996-2007) Junji Yodoi, M.D., D.Med.Sc. (1989-2010)

Department of Viral Oncology

Laboratory of Gene Analysis

Professor	Yoshinori Akiyama, D.Sc. (1988)
Associate Professor	Hiroyuki Sakai, D.Med.Sc. (1996) Hiroyuki Mori, D.Sc. (1996)
Assistant Professor	Shin-ichi Yanagawa, D.Agr. (1986)

Laboratory of Cell Regulation

Professor	Masahiko Sugita, M.D., D.Med.Sc. (2004)
Assistant Professor	Daisuke Morita, D.Med.Sc. (2013)
Assistant Professor (Spe.)	Tatsuaki Mizutani, Ph. D. (2014)

Laboratory of Tumor Biogenesis

Professor	Shin Yonehara, D.Sc. (1994) (concurrent)
Assistant Professor	Akira Murakami, D.Sc. (1979)

Laboratory of Human Tumor Viruses

Professor	Keizo Tomonaga, D.V.M., D.Vet.Med. (2011)
Associate Professor	Makoto Hijikata, D.Med.Sc. (1997)
Assistant Professor	Tomoyuki Honda, M.D., D.Med.Sc. (2011)

Department of Genetics and Molecular Biology

Laboratory of Molecular Genetics

Professor	Takashi Fujita, D.Sc. (2005)
Associate Professor	Hiroki Kato, D.Med.Sc. (2010)

Laboratory of Biochemistry

Professor	Mutsuhito Ohno, D.Sc. (2001)
Assistant Professor	Makoto Kitabatake, D.Sc. (2004)
	Ichiro Taniguchi, D.Sc. (2007)

Department of Biological Responses

Laboratory of Biological Protection

Professor	Koichi Ikuta, M.D., D.Med.Sc. (2002)
Assistant Professor	Keiko Takemoto, D.Sc. (1992)
	Shizue Tani-ichi, D.Health Sc. (2007)
	Takahiro Hara, D. Bio. (2008)
Technical Staff	Satsuki Kitano (Konaka) (2004)

Laboratory of Infection and Prevention

Professor	Osamu Takeuchi, M.D., Ph.D. (2012)
Associate Professor	Hiroshi Masutani, M.D., D.Med.Sc. (1992)
Assistant Professor	Takashi Mino, D.Eng. (2012)

Bioresponse Regulation Laboratory

Visiting Professor	Yoshihiro Kawaoka, D.V.M., D.Med.Sc. (2010)
Visiting Assistant Professor	Yasumasa Iwatani, Ph. D. (2014)

Department of Cell Biology

Laboratory of Subcellular Biogenesis

Professor	Fumiko Toyoshima, D.Sc. (2008)
Assistant Professor	Shigeru Matsumura, D.Bio. (2008)
Assistant Professor	Yukako Oda, D.Sc. (2014)

Laboratory of Growth Regulation

Professor	Ryoichiro Kageyama, M.D., D.Med.Sc. (1997)
Associate Professor	Toshiyuki Ohtsuka, M.D., D.Med.Sc. (2000)
Associate Professor (Spe.)	Itaru Imayoshi, D.Bio. (2008)
Assistant Professor	Taeko Kobayashi, D.Sc. (2005)
Assistant Professor (Spe.)	Tomoko Tateya, M.D., D.Med.Sc. (2008)

Laboratory of Signal Transduction

Associate Professor	Takayuki Miyazawa, D.V.M., D.Vet.Med. (2005)
---------------------	--

Laboratory of Regulatory Information

Visiting Professor	Susumu Tonegawa, Ph.D, D.Sc. (1992)
--------------------	-------------------------------------

Laboratory of Integrated Biological Information

Professor (Spe.)	Daron M. Standley, Ph.D. (2014)
------------------	---------------------------------

Center for Human Retrovirus Research

Head•Professor	Masao Matsuoka, M.D., D.Med.Sc. (2014)
Laboratory of Viral Pathogenesis	
Professor	Yoshio Koyanagi, M.D., D.Med.Sc. (2004)
Assistant Professor	Hiroataka Ebina, D.Med.Sc. (2009)
	Kei Sato, D.Med.Sc. (2012)
Laboratory of Virus Control	
Professor	Masao Matsuoka, M.D., D.Med.Sc. (1999)
Lecturer	Jun-ichirou Yasunaga, M.D., D.Med.Sc. (2010)
Assistant Professor	Kazuya Shimura, D.Med.Sc. (2011)
Technical Staff	Junko Tanabe (2006)
	Chiho Ohnishi (2014)
Laboratory of Viral Immunology	
Visiting Professor	Charles R. M. Bangham, Ph. D., MRC Path., Sc. D. (2014)

Experimental Research Center for Infectious Diseases

Head•Professor	Keizo Tomonaga, D.V.M., D.Vet. Med. (2012)
Laboratory of Primate Model	
Associate Professor	Tomoyuki Miura, D.V.M., D.Agr. (1988)
Assistant Professor	Takayuki Hishiki, D.Med.Sci. (2013)
Laboratory of Evolutional Virology	
Professor	Hirofumi Akari, D.V.M., D.Med.Sc. (2013) (concurrent)
Associate Professor	Takayuki Miyazawa, D.V.M., D.Vet.Med. (2005) (concurrent)
Assistant Professor (Spe.)	Amane Kogure, D.Med.Sc. (2013)
	Takeshi Yoshida, D.Med.Sci. (2013) (concurrent)
Technical Specialist	Hitoshi Miyachi (2006)
Technical Staff	Ai Dantsuka (2011)
	Ryota Mizuta (2014)

Center for Emerging Virus Research

Head•Professor	Masao Matsuoka, M.D., D.Med.Sc. (2014)
Professor (Spe.)	Tatsuhiko Igarashi, D.V.M., D.Med.Sc. (2014)
Assistant Professor (Spe.)	Akiko Makino, D.V.M.Ph.D (2012)
	Yohei Hizukuri, D.Sc (2013)
	Kenichi Kawano, Pharm. D. (2014)

Lecturers (part time)	Tetsuya Iida
	Nagatoshi Fujiwara
	Keizo Tokunaga
	Masayuki Saijo

Atsushi Kumanogo
Yumiko Imai
Takashi Yamamoto
Norihiro Okada
Akihide Ryo
Jun-ichi Fujisawa
Ken Maeda

Research Fellows

Eiji Ishii (Lab. of Gene Analysis)
Sulyi Kim (Lab. of Human Tumor Viruses)
Tomoko Imamura (Lab. of Infection and Prevention)
Daisuke Ori (Lab. of Infection and Prevention)
Atsuko Wakabayashi (Lab. of Infection and Prevention)
Sarang Tartey (Lab. of Infection and Prevention)
Akihiro Isomura (Lab. of Growth Regulation)
Yukiko Harima (Lab. of Growth Regulation)
Edward Wijaya (Lab. of Integrated Biological Information)
Rokusuke Yoshikawa (Lab. of Viral Pathogenesis)
Guangyong Ma (Lab. of Virus Control)

Library

Committee Chairman

Hiroshi Masutani

Administration Office

Chief Officer
General Affairs

Katsumi Sakamoto (2013)
Hiroyuki Matsunaga (2011)
Kazue Hattori (2013)

Note

*Spe. = Specific

■構 成 員（2014 年 12 月）

所 長
副 所 長

協 議 員

ウイルス研究所教授（併）
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授

小 柳 義 夫
秋 山 芳 展

米 原 伸
影 山 龍一郎
松 岡 雅 雄
大 野 睦 人
生 田 宏 一
小 柳 義 夫
杉 田 昌 彦
藤 田 尚 志
秋 山 芳 展
豊 島 文 子
朝 長 啓 造
竹 内 理

研 究 部

がんウイルス研究部門 がん遺伝子研究分野

教 授・京大理博
准 教 授・京大医博
准 教 授・阪大理博
助 教・京大農博

秋 山 芳 展
酒 井 博 幸
森 博 幸
柳 川 伸 一

細胞制御研究分野

教 授・京大医博
助 教・京大生命博
特定助教・東大医博

杉 田 昌 彦
森 田 大 輔
水 谷 龍 明

生体発がん機構研究分野

教 授（併）・京大理博
助 教・京大理博

米 原 伸
村 上 昭

ヒトがんウイルス研究分野

教 授・東大獣医博
准 教 授・信大医博
助 教・阪大医博

朝 長 啓 造
土 方 誠 之
本 田 知 之

遺伝子動態調節研究部門 分子遺伝学研究分野

教 授・早大理博
准 教 授・阪大医博

藤 田 尚 志
加 藤 博 己

情報高分子化学研究分野

教 授・京大理博
助 教・京大理博
助 教・京大理博

大 野 睦 人
北 畠 真 郎
谷 口 一 郎

生体応答学研究部門

生体防御研究分野

教 授・京大医博
助 教・京大理博
助 教・阪大保健博
助 教・京大生命博
技術職員

生 田 宏 一
竹 本 経緯子
谷 一 靖 江
原 崇 裕
小中(北野) さつき

感染防御研究分野

教 授・阪大医博
准 教 授・京大医博
助 教・京大工博

竹 内 理
増 谷 弘 史
三 野 享 史

応答調節研究分野

教 授・(客)
准 教 授・(客)

河 岡 義 裕
岩 谷 靖 雅

細胞生物学研究部門

構造形成学研究分野

教 授・京大理博
助 教・京大生命博
助 教・京大理博

豊 島 文 子
松 村 繁
小 田 裕香子

増殖制御学研究分野

教 授・京大医博
准 教 授・京大医博
特定准教授・京大生命博
助 教・京大理博
特定助教・京大医博

影 山 龍一郎
大 塚 俊 之
今 吉 格
小 林 妙 子
楯 谷 智 子

信号伝達学研究分野

准 教 授・東大獣医博

宮 沢 孝 幸

情報制御学研究分野

教 授・(客)

利根川 進

高次生体情報研究分野

特定教授・コロンビア大博

Daron M. Standley

附属ヒトレトロウイルス研究施設

ウイルス病態研究領域

教 授・京大医博
助 教・東北大医博
助 教・京大医博

小 柳 義 夫
蝦 名 博 貴
佐 藤 佳

ウイルス制御研究領域

施設長・教 授・熊大医博
講 師・熊大医博
助 教・京大医博
技術職員（臨床検査技師）
技術職員（臨床検査技師）

松 岡 雅 雄
安 永 純一朗
志 村 和 也
田 邊 順 子
大 西 知 帆

ウイルス免疫研究領域

教 授・(客) Charles R. M. Bangham

附属感染症モデル研究センター

センター長・教 授・東大獣医博	朝 長 啓 造
技術専門職員	宮 地 均
技術職員	團 塚 愛
技術職員	水 田 量 太

霊長類モデル研究領域

准 教 授・東大農博	三 浦 智 行
助 教・京大生命博	日紫喜 隆 行

進化ウイルス研究領域

教 授 (兼)・山口大獣医博	明 里 宏 文
准 教 授 (兼)・東大獣医博	宮 沢 孝 幸
特定助教・阪大医博	木 檜 周
特定助教 (兼)・京大医博	芳 田 剛

附属新興ウイルス研究センター

センター長・教 授・熊大医博	松 岡 雅 雄
特定教授・阪大医博	五十嵐 樹 彦
特定助教・東大医博	牧 野 晶 子
特定助教・名大理博	檜 作 洋 平
特定助教・京大薬博	河 野 健 一

非常勤講師

飯 田 哲 也
藤 原 永 年
徳 永 研 三
西 條 政 幸
熊ノ郷 淳
今 井 由美子
山 本 卓
岡 田 典 弘
梁 明 秀
藤 澤 順 一
前 田 健

事 務 部

事 務 長	坂 本 雄 美
総務掛長	松 永 裕 之
主 任	服 部 和 枝

研 究 員

がんウイルス (がん遺伝子)	石 井 英 治
がんウイルス (ヒトがんウイルス)	金 ソルイ
生体応答学 (感染防御)	今 村 智 子
生体応答学 (感染防御)	織 大 祐
生体応答学 (感染防御)	若 林 敦 子
生体応答学 (感染防御)	Sarang Tartey

細胞生物学 (増殖制御学)	磯 村 彰 宏
細胞生物学 (増殖制御学)	播 磨 有希子
細胞生物学 (高次生体情報)	Edward Wijaya
ヒトレトロウイルス (ウイルス病態)	吉 川 禄 助
ヒトレトロウイルス (ウイルス制御)	馬 広 勇

大 学 院 生

理学研究科大学院生

がんウイルス (がん遺伝子)	宮 崎 亮 次
がんウイルス (がん遺伝子)	秋 山 光市郎
がんウイルス (がん遺伝子)	三 登 一 八
がんウイルス (がん遺伝子)	椋 野 翠
がんウイルス (がん遺伝子)	水 野 慎 也
がんウイルス (がん遺伝子)	坂 下 宗 平
遺伝子動態調節 (情報高分子化学)	川 本 崇 仁
遺伝子動態調節 (情報高分子化学)	鈴 木 完

医学研究科大学院生

がんウイルス (がん遺伝子)	大 門 康 志
がんウイルス (細胞制御)	邑 田 悟
がんウイルス (ヒトがんウイルス)	惣 福 梢
がんウイルス (ヒトがんウイルス)	中 村 祥 子
生体応答学 (生体防御)	崔 広 為
生体応答学 (生体防御)	榛 葉 旭 恒
生体応答学 (感染防御)	若 林 寛 人

Cristiane Lumi Hirata

渡 邊 直 希

Shama Ratiram Bansod

細胞生物学 (増殖制御学)	小 林 久美子
細胞生物学 (増殖制御学)	荒 木 杏 奈
細胞生物学 (増殖制御学)	下 出 紗 弓
細胞生物学 (信号伝達学)	坂 口 翔 一
細胞生物学 (信号伝達学)	橋 本 暁
細胞生物学 (信号伝達学)	小 出 り え
ヒトレトロウイルス (ウイルス病態)	金 村 優 香
ヒトレトロウイルス (ウイルス病態)	山 田 英 里
ヒトレトロウイルス (ウイルス制御)	川 月 章 弘
ヒトレトロウイルス (ウイルス制御)	安 間 恵 子
ヒトレトロウイルス (ウイルス制御)	古 田 梨 愛
ヒトレトロウイルス (ウイルス制御)	三田上 侑 生
ヒトレトロウイルス (ウイルス制御)	Mohamed, Mohamed

Mahgoub Mohamed Ahmed

感染症モデル (霊長類モデル) 渡 部 祐 司

薬学研究科大学院生

ヒトレトロウイルス (ウイルス制御)	松 本 尚
--------------------	-------

細胞生物学（信号伝達学）
感染症モデル（霊長類モデル）

[illegible]

細胞生物字 (構造形成字)

服部山宮渡吉高山小劉小柳津赤長岡
部部本本邊岡間本嶋池井川堀谷川村
德祐侑步丈佑義祐將笑悠真陽祐
哉季枝己治弥晴介平舒斗瑚司一輝瞳

設	樂	宗	朗
阿	部	壯	岐
春	名	美	弥
波	多野	華	恵
濱	崎	真	弓
岩	野	さ	やか
石	橋	理	基
福	原	充	子

ヒトレトロウイルス（ウイルス制御）

池	田	愛
一	條	遼
米	田	織
森	崎	恵
小	浦	紀
東	月	夏
上	林	司
小	田	毅
前	本	樹
増	枝	尋
安	宮	平
松	尾	奈
神	田	平
上	定	平
紀	ノ	香

発 行 日	2015 年 6 月 22 日
発 行	京都大学ウイルス研究所
編 集	大 塚 俊 之
発行責任者	小 柳 義 夫



Institute for Virus Research
Kyoto University